PROTOPLASMA

IN VERBINDUNG MIT R. CHAMBERS UND W. SEIFRIZ

BEGRÜNDET VON FRIEDL WEBER UND JOSEF SPEK

UNTER BESONDERER MITWIRKUNG VON

J. BRACHET, BRUXELLES
N. KAMIYA, OSAKA
H. KINZEL, WIEN
A. PISCHINGER, WIEN
P. SITTE, HEIDELBERG
S. STRUGGER, MÜNSTER

HERAUSGEGEBEN VON

K. HÖFLER, WIEN
E. PERNER, HANNOVER
K. E. WOHLFARTH-BOTTERMANN, BONN

BAND LIV, HEFT 3

MIT 117 TEXTABBILDUNGEN

ABGESCHLOSSEN AM 20. OKTOBER 1961

WIEN

SPRINGER-VERLAG

1962

Protoplasma

Die Zeitschrift

Protoplasma

erscheint zwanglos in einzeln berechneten Heften wechselnden Umfanges, die zu Bänden von 600 bis 700 Seiten vereinigt werden.

Die Zeitschrift veröffentlicht Originalarbeiten, Kurze Mitteilungen, kritische Übersichtsartikel, Sammelreferate und Referate aus allen Gebieten der Protoplasmaforschung. Beiträge können in deutscher, englischer, französischer oder italienischer Sprache verfaßt sein.

Manuskripte sowie alle mit der Redaktion zusammenhängenden Fragen sind zu richten an:

Prof. Dr. K. Höfler, Pflanzenphysiologisches Institut der Universität Wien, Wien I, Dr.-Karl-Lueger-Ring 1, Österreich, oder

Prof. Dr. E. Perner, Botanisches Institut der Tierärztlichen Hochschule Hannover, Hannover-Kirchrode, Bünteweg 17, Westfalenhof, Deutschland, oder

Dozent Dr. K. E. Wohlfarth-Bottermann, Zentral-Laboratorium für angew. Übermikroskopie der Universität Bonn, Bonn, Poppelsdorfer Schloß, Deutschland.

Geschäftliche Mitteilungen, besonders alle Korrespodenz, die Sonderdrucke betrifft, sind an den

Springer-Verlag
Wien I, Mölkerbastei 5
Fernsprecher: 63 96 14 Serie - Telegrammadresse: Springerbuch Wien

zu richten.

Die Manuskripte sind vollständig druckreif einzusenden, so daß bei der Korrektur nur noch Druckfehler verbessert zu werden brauchen. Nachträgliche Änderungen, die 10% der Satzkosten übersteigen, müssen dem Autor in Rechnung gestellt werden.

Der Satz soll kurz gefaßt sein. Die Beiträge sollen im allgemeinen den Umfang von 1½ Druckbogen (=24 Druckseiten) nicht überschreiten. Bei längeren Arbeiten ist in der Sprache der Originalarbeit eine Zusammenfassung, die kurz zu halten ist, beizufügen. Es wird dem Autor freigestellt, zusätzlich eine kurze englische bzw. deutsche Zusammenfassung zu liefern. Literaturzitate sind, nach Autorennamen alphabetisch geordnet, am Schluß der Arbeit zu bringen.

Die Abbildungsvorlagen sind dem Manuskript auf gesonderten Blättern beizulegen. Sie müssen vollkommen nachbildungsfertig abgeliefert werden. Die Beschriftung der Abbildungen erfolgt durch den Verlag. Für die Reproduktion besonders reichen Illustrationsmaterials ist im Interesse der Bezieher der Zeitschrift ein Kostenbeitrag zu leisten. Farbige Abbildungen können nur auf Kosten des Autors gebracht werden.

Die Autoren erhalten 100 Sonderdrucke ihrer Arbeit kostenlos als Entgelt und können weitere Sonderdrucke zum angemessenen Preis beziehen. Die Bestellung muß mit einem dem Fahnenabzug beigelegten Bestellzettel erfolgen. Für Sammelreferate wird außerdem ein Unkostenersatz geleistet.

Es wird empfohlen, ausführlichere Richtlinien über die Beschaffenheit der Manuskripte und Abbildungsvorlagen bei den Herausgebern oder beim Verlag, die sie gerne zur Verfügung stellen, anzufordern.

Es werden nur unveröffentlichte Arbeiten aufgenommen; der Autor verpflichtet sich, diese auch nachträglich nicht anderweitig zu veröffentlichen. Mit der Annahme und Veröffentlichung des Manuskriptes geht das ausschließliche Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder auf den Verlag über. Es ist ferner ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages nicht gestattet, photographische Vervielfältigungen, Mikrofilme u. ä. von Heften der Zeitschrift, einzelnen Beiträgen oder von Teilen daraus herzustellen.

Der Verlag

LIV. Band — Inhaltsverzeichnis — 3. Heft

Turian, G.: Cytoplasmic Differentiation and Dedifferentiation in the Fungus *Allomyces* 323

Weissenfels, N.: Der Einfluß der Gewebezüchtung auf die Morphologie der Hühnerherzmyoblasten. (II. Die Herkunft und Entwicklung der Cytosomen) 328

Moericke, V., und **K. E. Wohlfarth-Bottermann:** Nachweis von virusartigen Partikeln in Prosekretgranula von Speicheldrüsen der Pfirsichblattlaus (*Myzus persicae*) 345

Hall, W. T., and **G. Claus:** Electronmicroscope Studies on Ultrathin Sections of *Oscillatoria Chalybea* Mertens 355

Jonek, J.: Über das Verhalten der Succinodehydrase in der normalen Nebenniere von Kaninchen und während der pharmakologischen Hypothermie 369

Kiermayer, O., und **R. Jarosch:** Die Formbildung von *Micrasterias rotata* Ralfs und ihre experimentelle Beeinflussung 382

Dugas, D. J., and **J. D. Bath:** Electron Microscopy of the Slime Mold *Physarum polycephalum* 421

Falk, H.: Zum Nucleolus-Feinbau bei *Allium cepa* 432

Kurze Mitteilung

Nagaich, B. B.: Leafhopper-Transmitted Plant Viruses: Few Additions. 440

Referate 441

Siegfried Strugger †

Aus Münster kommt uns die erschütternde Nachricht, daß Siegfried P. Strugger am 11. Dezember 1961 im 56. Lebensjahr verschieden ist. Mit ihm geht einer der begabtesten und genialsten Forscher von uns. Er war Schüler, war der Lieblingsschüler von Friedl Weber. Seit ich ihn 1924 in Graz kennenlernte, als er im 4. Semester stand, hat uns treue Freundschaft verbunden. Seine Karriere führte ihn über Greifswald, Gießen und Jena nach Hannover, wo er, jung schon, die botanische Lehrkanzel der Tierärztlichen Hochschule führte, und bald weiter auf das Ordinariat der Botanik in Münster. Sein wissenschaftlicher Aufstieg ist rasch erfolgt. Etwa seit 1936 fand er sein reichstes Arbeitsfeld auf dem Gebiet der Vitalfärbung und der Fluoreszenzmikroskopie, auf dem er dann wahrhaft bahnbrechend und wegweisend gewirkt hat. Die wichtigsten Beiträge sind ja in der Zeitschrift „Protoplasma", deren Mitherausgeber er 1933 wurde, veröffentlicht. Den Weg zur Übermikroskopie wiesen seine Studien über den Feinbau der Plastiden; er hat dann in Münster der Elektronenmikroskopie eine der ersten Pflegestätten innerhalb Deutschlands aufgebaut. — Strugger war ein glänzender Vortragender und begeisternder Lehrer. Seinem beginnenden Kehlkopfleiden hat er nicht nachgeben wollen und so ist er wohl als ein Märtyrer seines geliebten Lehrberufes von uns gegangen. Dankbar und treu werden die Protoplasmaforscher stets seiner gedenken.

Karl Höfler

Cytoplasmic Differentiation and Dedifferentiation in the Fungus *Allomyces*

By

Gilbert Turian

Institut de Botanique générale, Université de Genève

With 1 Figure

(Received March 16, 1961)

The most obvious criterion of the internal differentiation of the motile, normally uninucleate gametes in *Allomyces* is their peculiar nuclear cap, differentiated at the cleavage stage of the developing gametangia.

This nuclear cap represents a localized, cytoplasmic accumulation of basophilic material which responds to cytochemical tests for ribonucleic acid (RNA) (Turian 1955); the RNA is presumably bound to sulfhydril proteins constituting the ground substance of the cap (Turian 1956). Additional substances (*Fe*) may be present in it (Ritchie 1947).

As seen in ultrathin sections with the electron microscope (Turian and Kellenberger 1956), the cap in *Allomyces* gametes appears to consist of densely packed, RNA-protein granules (ribosomes), and is delimited from peripheral cytoplasm (hyaloplasm) by a double membrane with pores in it. Mitochondria and lipid granules are dispersed in the polysaccharide-containing hyaloplasm (Turian 1958). Electron microscopy has also revealed a highly-developed internal system of transverse lamellae in the mitochondria of *Allomyces* gametes.

Little is known concerning the origin of the nuclear cap. The prominent decrease in the volume of nuclei (average diameter $5\,\mu \rightarrow 3\,\mu$) and their nucleoli, along with the appearance of basophilic masses aggregating in single nuclear caps in each of the pre-gametic regions of the gametangial cytoplasm might indicate a nuclear origin of the cap. However, no direct evidence for migration of small, RNA-protein granules from the nucleolus through the pores of the nuclear membrane has yet been obtained. Indirect evidence, derived from examination of ultrathin sections of gametangia at their cleavage stage, tends rather to indicate an aggregation process of the preexisting granular material (ribosomes) at the point of origin of the nuclear cap in the cytoplasm of differentiating gametes (Blondel and Turian 1960). Convergence of cytoplasmic granules around the nuclear

membrane could, however, occur simultaneously with transfer of nuclear material through the pores. Careful examination of ultrathin sections does not reveal any conspicuous presence of granular, electron-absorbing material in the lumen of the nuclear pores. The possibility of active synthesis of RNA at the origin of the nuclear cap in gametangia, parallel to the aggregation process of the preexisting ribosomes, must also not be overlooked, particularly in view of the lowering DNA/RNA ratios measured at the cleavage stage in the sporangia of the closely related mould *Blastocladiella* (Turian and Cantino 1959). Likewise, a prominent increase in O_2-consumption points to energy requirements for anabolic processes at this stage of development in *Allomyces* (Turian and Chodat 1959).

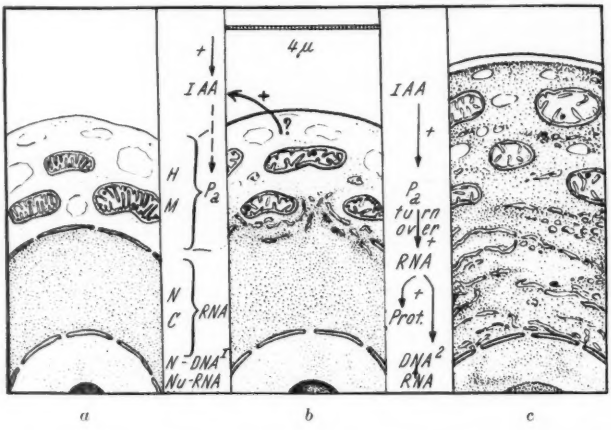


Fig. 1. Structural and functional stages in the germination of the zygote of *Allomyces macrogynus Emers.* (*a*) Zygote with spatial separation of the RNA-containing nuclear cap (*NC*) and the phosphatase (*Pa*)-positive hyaloplasm (*H*) and mitochondria (*M*). (*b*) Incipient germination stage with early indications of disintegration of the nuclear cap (ribosomal invasion of the hyaloplasm). This stage, concomitant with the rhizoid emergence, is stimulated by exogenous—or induced by endogenous?—indole acetic acid (IAA, $2 \cdot 10^{-5}$ M). This auxin, through activation of phosphatases (Turian, G., 1957, Experientia *13*, 368), awakens the turn-over of RNA necessary for proteosynthesis (Prot.). (*c*) Young germling with total intermingling of mitochondria (looser lamellae) and ribosomes (plus membranes) favorable for active RNA-protein synthesis. Progressive enlargement of the nucleus (*N*) accompanies DNA replication preceding 1st mitosis (*DNA 1* → *DNA 2*). Changes are also noticeable in the nucleolus (*Nu-RNA*).

Dedifferentiation is the necessary corollary of differentiation in the developmental cycle of microorganisms. In *Allomyces* (and *Blastocladiales* in general) it manifests its rejuvenating effects with particular clarity during the first phase of germination of zoospores or zygotes where disintegration of the nuclear cap is the most spectacular dedifferentiative event (Hatch

1938; Emerson 1941). Its study may also provide important clues for our understanding of the differentiation.

We have observed that this disintegrative process corresponds to the redistribution of basophilic RNA-protein material in the whole cytoplasm of the germinating zygote in *Allomyces* or the germinating zoospore in *Blastocladiella*. Parallel examination of ultrathin sections of these young germlings in *Allomyces* shows that the granular component is visible up to the limit of the electron-transparent chitinous wall (Fig. 1).

The fundamental, physiological consequence of the nuclear cap disintegration is the renewal of intimate contact between mitochondria and the RNA-protein granules. Such contact may be vizualized as a requirement for the reawakening of the RNA-proteosynthesis system (in the sense of Brachet 1956, 1960), thus ensuring germination. Interestingly enough, this complex process is stimulated by 2.10^{-5} M of β-indole acetic acid (IAA), in *Allomyces* (Fig. 1) as well as *Blastocladiella*.

Our preceding observations point to the profound significance of the *spatial* separation of the RNA-protein granules and the mitochondria for the maintenance of gametic or zoosporic cytoplasm in a differentiated, non proliferating condition during the motility stage of these aquatic molds. At an enzymatic level, this spatial separation seems also to apply to enzymes involved in nucleic acid metabolism, e. g., the phosphatases, which have been demonstrated cytochemically (Gomori techniques) to be concentrated in the mitochondria and general hyaloplasm surrounding the phosphatase-negative nuclear cap (for alkaline phosphatase, Turian 1958). This spatial, differentiative separation between enzymes and prospective substrates (polynucleotides, nucleotides, etc.) ends with the start of dedifferentiation (first, incipient germination stage) as described in Fig. 1.

Striking changes in internal structure of the mitochondria also accompany differentiation and dedifferentiation in *Allomyces*: the loose and poorly developed lamellar system in germling- and hyphal-mitochondria contrasts sharply (Fig. 1) with the elaborate, lamellar system of the mitochondria of motile cells (Blondel and Turian 1958). Interestingly enough, these last cells exhibit a much higher rate of O_2-uptake than the germlings as measured in *Blastocladiella* (McCurdy and Cantino 1960).

A last point about the nuclear cap requires mention here: the first mitosis in young germlings of *Blastocladiella emersonii* is preceded by a doubling of their deoxyribonucleic acid (DNA) content without a simultaneous change in the per cell concentration of total nucleic acids (Turian and Cantino 1959). This leaves us with the suggestive evidence that, aside from its previously-assumed function in the resumption of protein synthesis, the nuclear cap might also provide the necessary nucleic acid precursors for partial DNA synthesis preceding the first mitosis during germination of the spores of the *Blastocladiaceae*. Thus, there seems to be little doubt that the functional significance of the nuclear cap lies in a subtile balance in the interchange of nucleic acid components between nuclei and cytoplasm. This finds visible expression in the alternative,

dimensional changes of nuclei at differentiative (see p. 323) and dedifferentiative (Fig. 1) stages of the development in *Allomyces*.

Summary

The basophilic nuclear cap, main criterion of intracellular differentiation in the gametes of *Allomyces*, has been studied as for its origin in the gametangia (ribosomal aggregation process combined with RNA-protein neosynthesis) and its disintegration in the zygotes at germination. At this stage, spatial separation of ribosomal material and phosphatase-positive mitochondria comes to an end through some kind of auxinic incitement. The RNA nuclear cap appears also as contributing some of its material for the DNA doubling preceding first mitosis in the germlings.

Résumé

Le corps paranucléaire basophile, principal critère de la différenciation intracellulaire des gamètes d'*Allomyces*, a été étudié à deux points de vue : 1) son origine : aggrégation de ribosomes préexistants dans les gamétanges, combinée avec une néosynthèse d'ARN-protéines ; 2) sa désintégration dans les zygotes en germination, mettant fin à la séparation spatiale du matériel ribosomique et des mitochondries phosphatase +, à la suite de quelque incitation de nature auxinique. La matière ribonucléique du corps paranucléaire paraît contribuer, dans une certaine mesure, au doublement de la teneur nucléaire en ADN intervenant avant la première mitose dans les plantules.

References

Blondel, B., and G. Turian, 1958: Étude sur la champignon *Allomyces macrogynus*. Proc. 4th Intern. Conf. Electron Microsc., Berlin.

— 1960: Relation between basophilia and fine structure of cytoplasm in the fungus *Allomyces macrogynus* Em. J. Biophys. Biochem. Cytol. *7*, 127.

Brachet, J., 1956: Les facteurs d'activation et d'inhibition de la synthèse des protéines. Exposés actuels de Biologie cellulaire (Biocytologia), Masson & Cie, Paris.

— 1960: Ribonucleic acids and the synthesis of cellular proteins. Nature *186*, 194.

Emerson, R., 1941: An experimental study of the life cycles and taxonomy of *Allomyces*. Lloydia *4*, 77.

Hatch, W. R., 1938: Conjugation and zygote germination in *Allomyces arbuscula*. Ann. Bot., N. S. *2*, 583.

McCurdy, H. D., and E. C. Cantino, 1960: Isocitritase, glycine-alanine transaminase and development in *Blastocladiella emersonii*. Plant Physiol. *35*, 463.

Ritchie, D., 1947: The formation and structure of the zoospores in *Allomyces*. J. Elisha Mitchell Sci. Soc. *63*, 168.

Turian, G., 1955: Sur la nature ribonucléique du corps paranucléaire et ses relations avec la différenciation du sexe chez *Allomyces javanicus*. C. r. Acad. Sci. (Paris) *240*, 2343.

— 1956: Le corps paranucléaire des gamètes géants d'*Allomyces javanicus* traité à l'acide borique. Protoplasma *47*, 135.

— 1958: Recherches sur les bases cytochimiques et cytophysiologiques de la morphogenèse chez le champignon aquatique *Allomyces*. Rev. Cytol. Biol. vég. *19*, 241.

Turian, G., and E. Kellenberger, 1956: Ultrastructure du corps paranucléaire, des mitochondries et de la membrane nucléaire des gamètes *d'Allomyces* macrogynus. Exper. Cell Research *11*, 417.
— and E. C. Cantino, 1959: The stimulatory effect of light on nucleic acid synthesis in the mould *Blastocladiella emersonii*. J. Gen. Microbiol. *21*, 721.
— et F. Chodat, 1959: Recherches comparatives sur la respiration des phases gamétophytique et sporophytique du développement chez *Allomyces*. Physiol. Plantarum *12*, 70.

Anschrift des Verfassers: Dr. Gilbert Turian, Institut de Botanique générale, Université de Genève, Genève (Schweiz).

Der Einfluß der Gewebezüchtung auf die Morphologie der Hühnerherzmyoblasten

II. Die Herkunft und Entwicklung der Cytosomen

Von

Norbert Weissenfels

Aus dem Zoologischen Institut und dem Zentrallaboratorium für angewandte Übermikroskopie der Universität Bonn

Mit 8 Textabbildungen

(Eingegangen am 15. April 1961)

Einleitung

In vitro gezüchtete Hühnerherzmyoblasten enthalten in ihrem Cytoplasma neben den Fadenmitochondrien und den kleinen Promitochondrien vielfach auch noch mehr oder weniger große, ei- bis kugelförmige Cytosomen, die ihre Form und Lage rasch verändern können und im Phasenkontrast gut sichtbar sind (Abb. 1). Sie nehmen die Vitalfarbstoffe Trimethylthionin (Lasfarguès und Di Fine 1950), Nilblausulfat (Tanaka 1933, Baker 1939, Wendt 1961) und Chrysoidin (Monné 1948) elektiv an. Im fixierten Zustand kann man sie darstellen mit Osmiumtetroxyd (Hirsch 1939), mit Sudan-Schwarz B (Baker 1944), mit dem Perjod-Schiff-Reagens zum Nachweis von Polysacchariden (Chu und Swinyard 1956, Schulz und Paola 1958, Wendt 1961) und mit Nilblausulfat nach Menschick, das Esterphosphatide nachweist (Wendt 1961). Im elektronenmikroskopischen Bild lassen sie einen komplizierten lamellären Aufbau erkennen (Weissenfels 1959a und b), ähnlich wie die von Schulz und Paola (1958) beschriebenen Cytosomen, mit denen sie auch bezüglich ihrer färberischen Eigenschaften weitgehend übereinstimmen[1].

Zur Klärung der Frage, ob die Cytosomen einen ständigen Bestandteil der Myoblasten darstellen, wurden folgende Untersuchungen durchgeführt.

Material und Methoden

Myoblasten aus der Herzspitze 9 Tage alter Hühnerembryonen (weiße Leghorn) wurden direkt bzw. nach ½, 1, 1½, 10, 60 und 90 Tagen Gewebekultur fixiert und

[1] Dasselbe gilt für die Golgi-Körper im Sinne von Hirsch (1939).

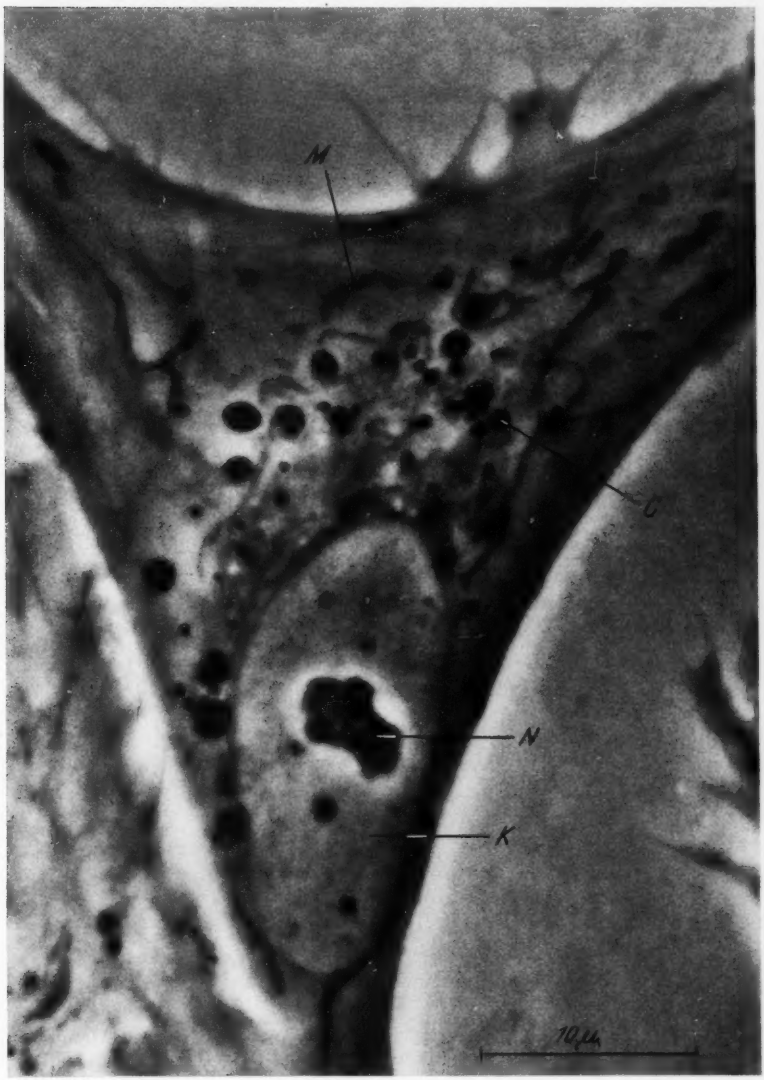


Abb. 1. Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme eines lebenden Hühnerherzmyoblasten nach einem Tag Gewebekultur. K = Kern, N = Nukleolus, M = Mitochondrium, C = Cytosom. Vergr.: 3500 : 1.

für die elektronenmikroskopische Untersuchung weiterverarbeitet. Auf eine ausführliche Beschreibung der Züchtungsmethode und des Präparationsganges kann ich hier verzichten, weil sie bereits im ersten Teil dieser Arbeit enthalten ist (Weissenfels 1961).

Ergebnisse

Unsere ersten Kenntnisse über die Entstehung der Cytosomen stammen aus phasenoptischen Lebendbeobachtungen junger Myoblastenkulturen. Wenige Stunden nach dem Ansetzen solcher Kulturen wachsen die Myoblasten aus dem Mutterstück heraus in das Kulturmedium hinein. Sie enthalten zahlreiche, etwa 1/3 bis ½ μ große „Plasmakügelchen", die mit dem Plasmastrom im Zellkörper umherwandern, und von denen ein beträchtlicher Anteil schon nach ½ bis 1 Tag zu 2 bis 3 μ großen Cytosomen heranwächst. In der Folge entwickeln sich aus den immer wieder neu auftretenden, sehr kleinen Vorstufen ständig neue Cytosomen, die mitunter die Myoblastenzelle überschwemmen, deren Anzahl aber durch die Zellteilungen periodisch reduziert wird.

Nach den lichtmikroskopischen Beobachtungen stand fest, daß die Herkunft und Entwicklung der Cytosomen nur mit Hilfe des Elektronenmikroskops aufgeklärt werden konnte. Um bei der Analyse der Cytosomenentwicklung sicher zu gehen, wurden die Myoblasten zunächst vom 10. Kulturtage an rückwärts untersucht. Dabei wurden alle Cytosomenvorstufen aufgefunden. Ich folge nun nicht dem Verlauf dieses Versuches, sondern beginne der besseren Darstellung wegen mit der Ausgangsform der Cytosomen und schließe daran den Entwicklungsgang an.

Die Myoblasten des embryonalen Hühnerherzens enthalten *in vivo* keinerlei Plasmadifferenzierungen, die in ihrem Feinbau mit den Endstadien der Cytosomen *in vitro* vergleichbar sind. Zwar lassen sich die phasenoptisch bereits sichtbaren, 1/3 bis ½ μ großen Ausgangsformen der Cytosomen in den elektronenmikroskopischen Bildern auffinden, diese besitzen jedoch noch keine lamellären Innenstrukturen, sondern nur eine feinkörnelige bzw. -fädige Grundsubstanz, die durch eine einfachkonturierte Hüllmembran klar vom umgebenden Cytoplasma abgegrenzt ist (Abb. 2 *a*). Die Grundsubstanz ist häufig durch eine hellere Randzone von der Hüllmembran abgesetzt, eine Erscheinung, die möglicherweise durch die Präparation verursacht ist. Entsprechende Plasmakörperchen enthalten auch die gezüchteten Myoblasten (Abb. 2 *b*). Sie sind identisch mit den Promitochondrien (Weissenfels 1958 a und b) bzw. den *„microbodies"* (Rhodin 1954, Bernhard und Rouiller 1956, Belt 1958), aus denen sich normalerweise die Fadenmitochondrien entwickeln.

In den Myoblastenkulturen aller Altersstufen findet man neben diesen kleinen Promitochondrien viel häufiger etwas größere Formen mit einer relativ lockeren Grundsubstanz (Abb. 2 *c* und *d*). Hierbei muß es sich um geschwollene Promitochondrien handeln, denn sie können — ebenso wie die kleinen Formen — in ihrer Grundsubstanz gewisse Lamellensysteme aufbauen (Abb. 3 *a*), die sich normalerweise zu den *Cristae mitochondriales* weiterentwickeln (Weissenfels 1958 b). Bei den gezüchteten Myoblasten wird der Entwicklungsgang der Promitochondrien an dieser Stelle entschei-

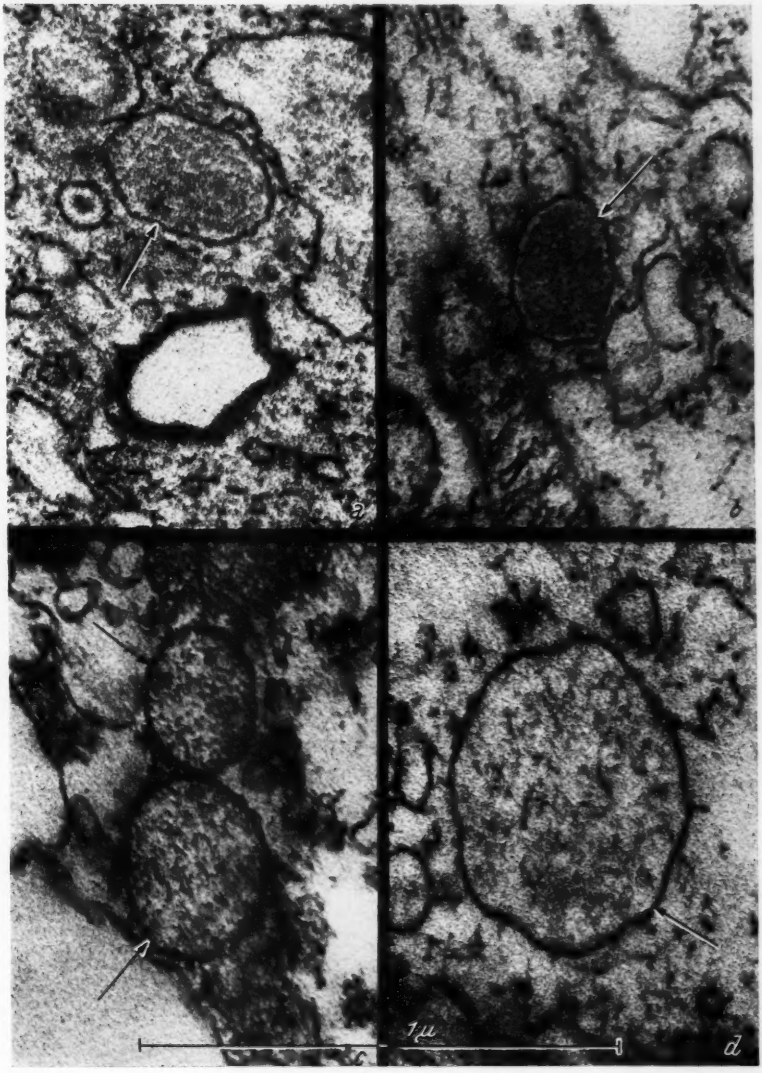


Abb. 2. Promitochondrien mit einfachkonturierter Außenhülle und feinkörneliger bzw. -fädiger Grundsubstanz. Vergr. der Abb. 2—8: 77.000 : 1. Abb. 2*a in vivo*; alle weiteren Aufnahmen beziehen sich auf Gewebekulturen.

dend verändert, denn sie erzeugen jetzt in ihrem Innern gekrümmte (Abb. 3 *b*) oder sogar kreisförmig geschlossene Membransysteme (Abb. 3 *c*), die zwar noch eine gewisse Verwandtschaft mit den Frühformen der *Cristae mitochondriales* aufweisen, durchweg aber kontrastreicher sind als diese. Ihr Kontrast wird häufig noch verstärkt durch eine mehr oder weniger vollständige Verklebung der Doppelmembranen und auch der Membranpaare unter sich. Die in den Abb. 3 *b* und *c* gezeigten Gebilde stellen bereits junge Cytosomen dar. Sie enthalten noch die gleiche Grundsubstanz (insbesondere in Abb. 3 *c* sichtbar), mit der z. B. das Promitochondrium in Abb. 2 *d* angefüllt ist. Damit erscheint die Herkunft der Cytosomen aus Promitochondrien eindeutig geklärt.

Die jungen Cytosomen treten in mannigfaltigen Ausführungen auf, die auch mehr oder weniger deutlich eine Verwandtschaft mit den Mitochondrien erkennen lassen. Von besonderem Interesse ist hier ein birnenförmiges Gebilde (Abb. 3 *d*), das in seinem unteren Bereich ringförmig angeordnete Doppelmembranen enthält, also Merkmale eines Cytosoms aufweist. Sein Oberteil ist jedoch mitochondrienartig ausgewachsen und enthält auch noch einige schwach ausgebildete *Cristae*. Hier liegt also eine Zwitterform vor, welche die Abstammung der Cytosomen und Mitochondrien von einer gleichartigen Vorstufe, den Promitochondrien, noch einmal belegt.

Die jungen Cytosomen bilden in der Regel nicht nur ein, sondern auch zwei (Abb. 4 *a*), drei (Abb. 4 *b*) oder noch mehr kreis- bzw. spiralförmige Lamellensysteme aus (Abb. 4 *c* und *d*), welche immer in die Promitochondrien-Grundsubstanz eingebettet sind (Abb. 4 *a* und *b*). Die Innenmembranen der jungen Cytosomen treten häufig paarweise auf (Abb. 4 *b*) und erinnern dann stark an die *Cristae* der Mitochondrien.

Wie eingangs bereits erwähnt wurde, können die jungen Cytosomen innerhalb eines Tages mehrere μ groß werden. An Hand von elektronenmikroskopischen Bildern läßt sich diese Entwicklung leicht rekonstruieren. Die Abb. 5 und 6 stellen etwa 2 μ große Cytosomen dar, die aus Membransystemen aufgebaute Untereinheiten mit einem meistens nur schwach strukturierten Innenraum enthalten. Diese Cytosomen besitzen durchweg eine einfachkonturierte Außenhülle. Ihre Membransysteme setzen sich — wie in den jüngeren Stadien — aus dicht gepackten Lamellenpaaren zusammen, die ganz ähnlich aufgebaut sind wie die *Cristae* des ausdifferenzierten Mitochondriums in der linken unteren Ecke der Abb. 5 (*M*). In den großen Cytosomen bleiben die Membranpaare häufig nicht auf einzelne Innenkörper beschränkt, sondern greifen auch auf benachbarte über, wodurch der Eindruck eines komplizierten Geflechtes entsteht, das in eine mehr oder weniger stark osmiophile Grundmasse eingebettet ist. Die Verwandtschaft der großen Cytosomen mit den Mitochondrien zeigt sich auch an manchen Cytosomen-Innenkörpern, die eine doppeltkonturierte Außenhülle besitzen sowie regelrechte *Cristae* enthalten und daher wie kleine Mitochondrien aussehen. Ein solches Gebilde erkennt man am unteren Rande des Cytosoms der Abb. 5 (P f e i l).

Einige Stunden nach dem Auftreten der großen Cytosomen, wie sie in den Abb. 5 und 6 dargestellt sind, trifft man andere Formen mit veränder-

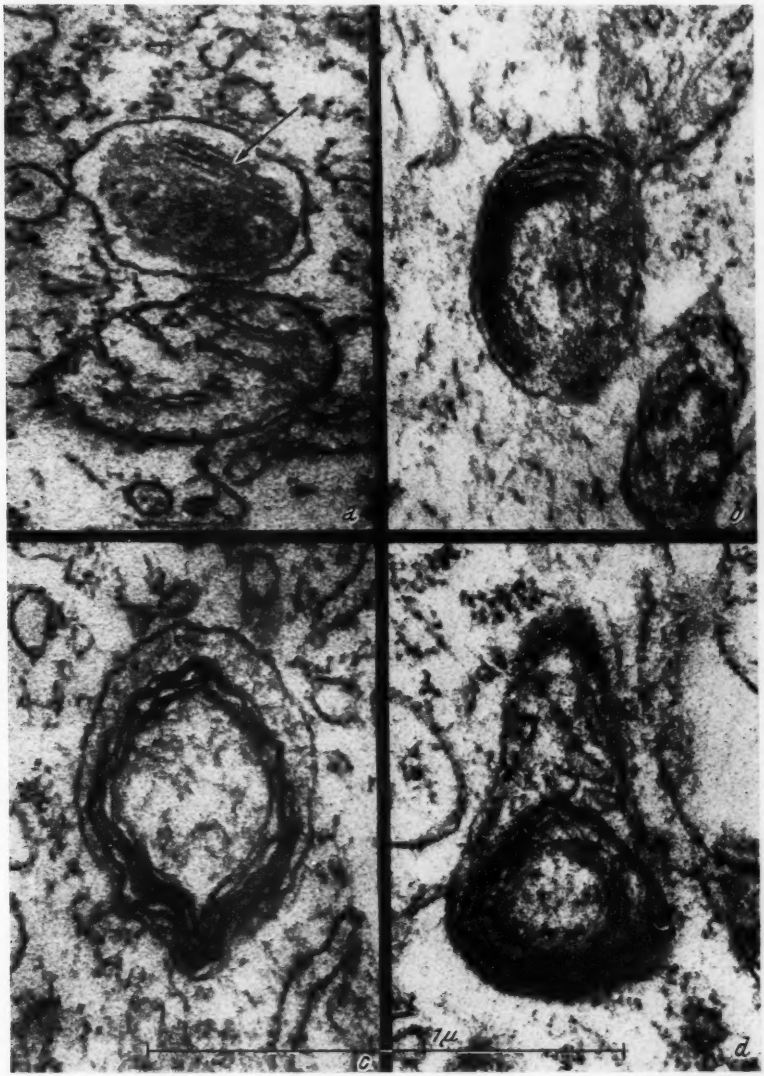


Abb. 3 *a*. Promitochondrium, in dessen Grundsubstanz die Anfänge eines Lamellensystems erkennbar sind (Pfeil). Darunter liegt ein ausdifferenziertes Mitochondrium. Abb. 3 *b* und *c*. Junge Cytosomen mit gekrümmten (Abb. 3 *b*) bzw. kreisförmig geschlossenen Membranen (Abb. 3 *c*). Abb. 3 *d*. Zwitterform aus Cytosom und Mitochondrium. Der kugelförmige Unterteil enthält ein geschlossenes Membransystem (Cytosom); im Oberteil liegen schlecht ausgebildete *Cristae* (Mitochondrium).

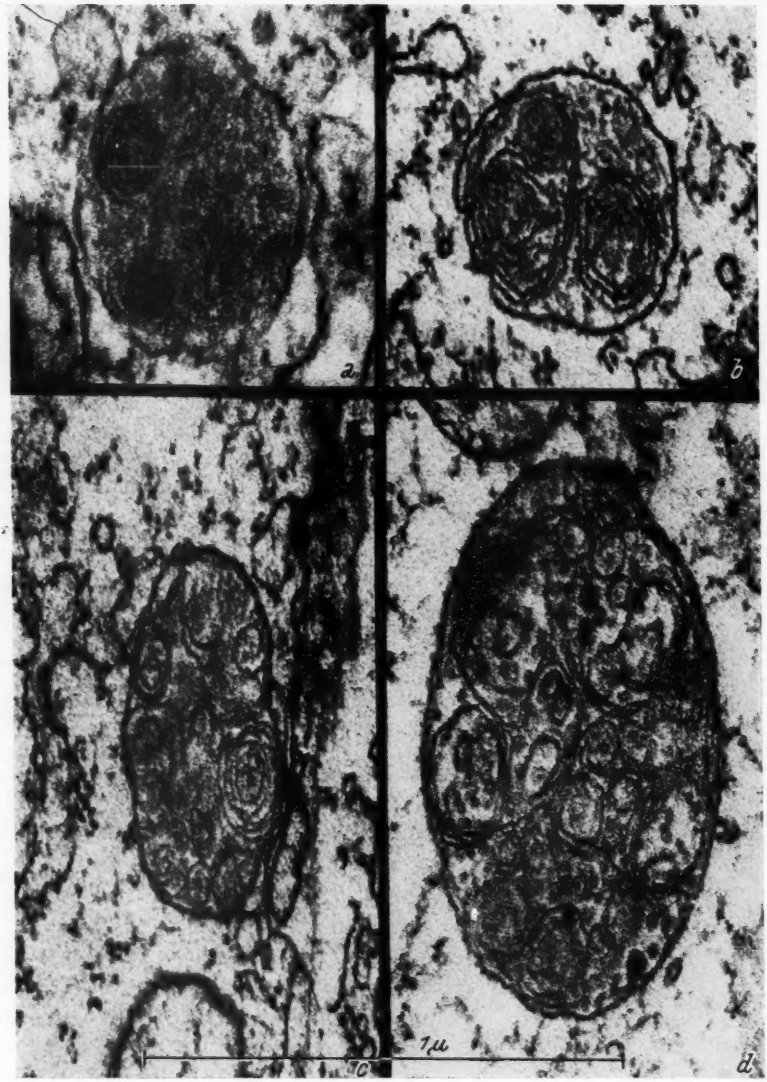


Abb. 4. Junge Cytosomen mit zwei (Abb. 4 *a*), drei (Abb. 4 *b*) oder mehr kreis- bzw. spiralförmigen Lamellensystemen (Abb. 4 *c* und *d*). Die Lamellen treten häufig paarweise auf.

ten Innenstrukturen an, von denen ein Beispiel angeführt sei (Abb. 7). Dieses Cytosom enthält nur relativ wenige Membransysteme und besitzt auch nicht die übliche Ordnung in seinem Feinbau. Der Innenraum des Cytosoms ist vielmehr weitgehend mit 400—600 Å großen Bläschen angefüllt, deren einfache Wandung so dick und kontrastreich ist wie die Einzelelemente der Membransysteme. Da diese kleinen Bläschen niemals in jüngeren Cytosomen angetroffen werden, liegt die Vermutung nahe, daß sie sich auf Kosten der Lamellensysteme entwickelt haben, und zwar als Abschnürungsprodukte von Membranpaaren (Pfeile). Ähnliche Vorgänge sind von anderen Autoren schon mehrfach diskutiert worden.

Mit dem in Abb. 7 dargestellten Stadium ist die Entwicklung der Cytosomen abgeschlossen. Ihre Größe beträgt in diesem Zustand in der Regel mindestens 2 μ; sie können aber auch beträchtlich größer sein.

Von phasenoptischen Untersuchungen her ist verläßlich bekannt, daß die „reifen" Cytosomen in zahlreiche Einzelgebilde zerfallen können, ein Vorgang, der durch ionisierende Strahlen beschleunigt wird (Wendt 1961). Bei der Suche nach diesen Zerfallsprodukten wurden in genügend lange gezüchteten Myoblasten tatsächlich ½ bis ¾ μ große Plasmakörperchen aufgefunden, und zwar in zweifacher Ausführung.

Die erste Form besitzt ein randständiges Membransystem, das einen weitgehend leeren Raum umschließt (das Gebilde in der Mitte der Abb. 8 *a*, ferner drei Körperchen in der rechten Hälfte der Abb. 8 *b*, die tangential getroffen wurden und durch Pfeile markiert sind). Diese Gebilde kann man nicht mit den Promitochondrien bzw. den Ausgangsformen der Cytosomen verwechseln, die ja nur eine einschichtige Außenhülle besitzen.

Die zweite Form (Abb. 8 *b*, links) ist angefüllt mit kleinen Bläschen, welche in Gestalt und Größe denen des reifen Cytosoms der Abb. 7 vollständig entsprechen. Eine Ähnlichkeit mit den *„micro-vesicular bodies"*, die u. a. Mollenhauer und Zebrun (1960), Nilsson (1959 a) und Haguenau (1960) beschrieben haben, ist unverkennbar.

Ungeklärt bleibt die Frage, ob die großen Cytosomen erst auf dem Stadium der Bläschenbildung (Abb. 7) in Untereinheiten zerfallen oder auch schon früher, nämlich nach Fertigstellung der lamellären Innenkörper (Abb. 6).

Abschließend kann gesagt werden, daß die Cytosomen der Hühnerherzmyoblasten aus den Promitochondrien entstehen und rasch zu einer Größe von mehreren μ heranwachsen. Nach einem gewissen Reifungsprozeß zerfallen sie in ihre Untereinheiten. Dieser Vorgang wiederholt sich, so daß bei älteren Myoblastenkulturen alle Entwicklungsstadien der Cytosomen nebeneinander vorliegen.

Erwähnt werden muß hier noch, daß die gezüchteten Myoblasten neben den Cytosomen auch reguläre Mitochondrien in ausreichender Menge enthalten, die sich allem Anschein nach überwiegend durch Fragmentation vermehren. Die Frage, ob aus den Promitochondrien in Gewebekultur auch Mitochondrien entstehen können, muß vorerst offen bleiben.

Die Cytosomen unterscheiden sich grundlegend von den transformierten Mitochondrien (Weissenfels 1961), denn erstere entstehen unmittelbar

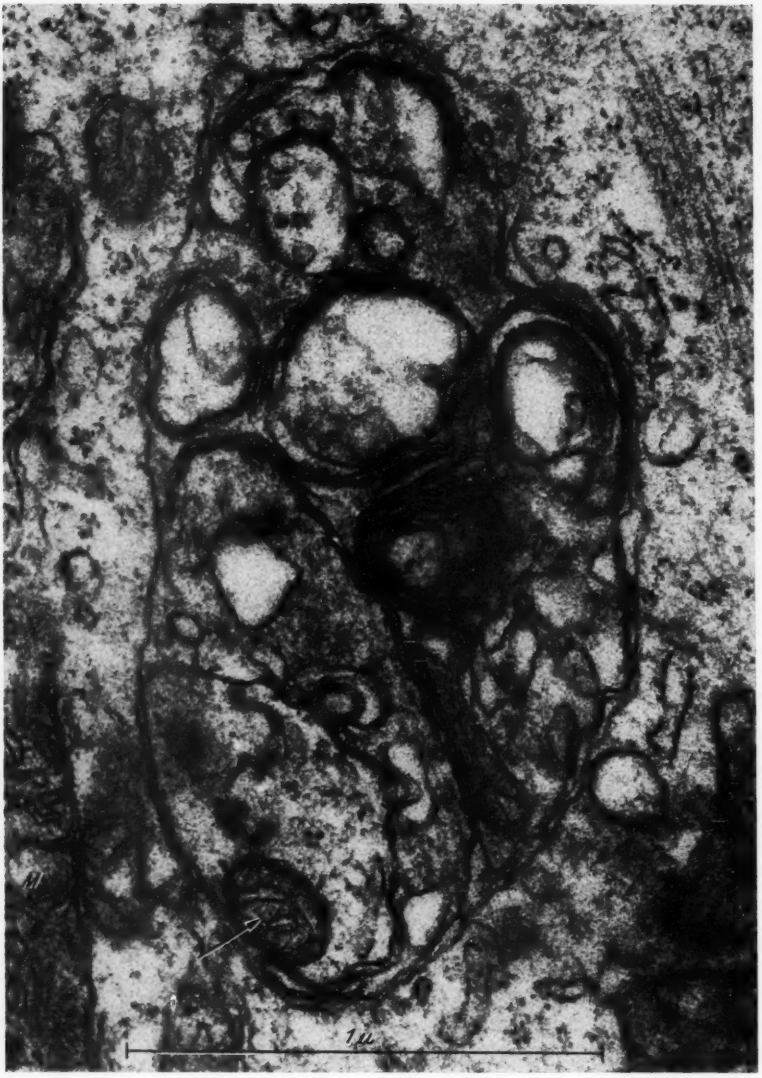


Abb. 3. Großes Cytosom mit lamellären Untereinheiten. Die Lamellen treten häufig paarweise auf und erinnern an die *Cristae mitochondriales* (linke untere Bildecke, *M*). Ein Innenkörper des Cytosoms (P f e i l) sieht wie ein kleines Mitochondrium aus.

Abb. 6. Großes Cytosom mit lamellären Untereinheiten. Die Membranen benachbarter Innenkörper sind oft ineinander verschlungen.

nach Kulturbeginn aus den Promitochondrien, letztere dagegen entwickeln sich erst nach längerer Kulturdauer aus fertigen Mitochondrien und besitzen im Endstadium nur ein einziges, randständiges Lamellensystem. Der Einfluß der Gewebezüchtung macht sich also bei den Promitochondrien bedeutend schneller bemerkbar als bei den ausdifferenzierten Mitochondrien. In beiden Fällen wachsen die *Cristae* ungewöhnlich stark heran und ordnen sich zu ei- bis kugelförmigen Doppelmembransystemen.

Nachdem die Herkunft, die Entwicklung und der Feinbau der Cytosomen bekannt sind und wir auch wissen, daß sie in den Myoblasten unter dem Einfluß der Gewebekultur entstehen, bleibt noch die Frage zu klären, ob die stoffliche Zusammensetzung der Cytosomen anders ist als die der regulären Mitochondrien. Hierzu war die Aufarbeitung von Zellhomogenaten von vornherein wenig aussichtsreich, weil die Cytosomen wahrscheinlich gemeinsam mit den Mitochondrien in ein und dieselbe Zellfraktion gelangen und sich dann der genauen chemischen Analyse entziehen. Aus diesem Grunde führte Wendt (1961) in unserem Institut Vitalfärbungen und cytochemische Untersuchungen an Myoblastenkulturen durch, deren Resultate ich hier noch einmal zusammenfasse. Seiner Arbeit entnehme ich zunächst die Ergebnisse über einige Vitalfärbungen (+ = positiver, − = negativer Verlauf der Färbung).

	Janusgrün und Diäthylsafranin	Trimethylthionin	Nilblausulfat	Chrysoidin
Cytosomen	−	+	+	+
Mitochondrien	+	−	−	−

Die Cytosomen können also das Janusgrün und sein Spaltprodukt, das Diäthylsafranin, nicht absorbieren. Wahrscheinlich sind sie unfähig, die genannten Farbstoffe enzymatisch zur Leukoform zu reduzieren, wozu die Mitochondrien durchaus in der Lage sind (Zeiger 1955).

Die Cytosomen lassen sich ferner mit Trimethylthionin, Nilblausulfat und Chrysoidin darstellen und werden in OsO_4-haltigen Fixierungsgemischen schon in kurzer Zeit tief schwarz. Nach Formolfixierung (1%ige Lösung in physiologischer Lösung nach Pannet und Compton) bleiben sie gut erhalten und können mit Sudan-Schwarz B angefärbt werden. Alle diese Befunde deuten auf einen hohen Fettgehalt der Cytosomen hin.

Die Nilblau-Reaktion nach Menschick verlief bei den Cytosomen ebenfalls positiv, und zwar wurden die Randregionen der Cytosomen und ihrer Untereinheiten, also die lamellären Bestandteile, blau bis blaugrün angefärbt. Diese Reaktion beruht nach Lipp (1958) auf der Eigenschaft der Nilblausulfatlösung, mit Esterphosphatiden stabile, blaue oder blaugrüne Komplexe einzugehen. Wir müssen daher annehmen, daß die Membransysteme der Cytosomen zu einem hohen Prozentsatz Esterphosphatide enthalten. In den Mitochondrien dagegen sind diese Stoffe in solchen Mengen nicht vorhanden.

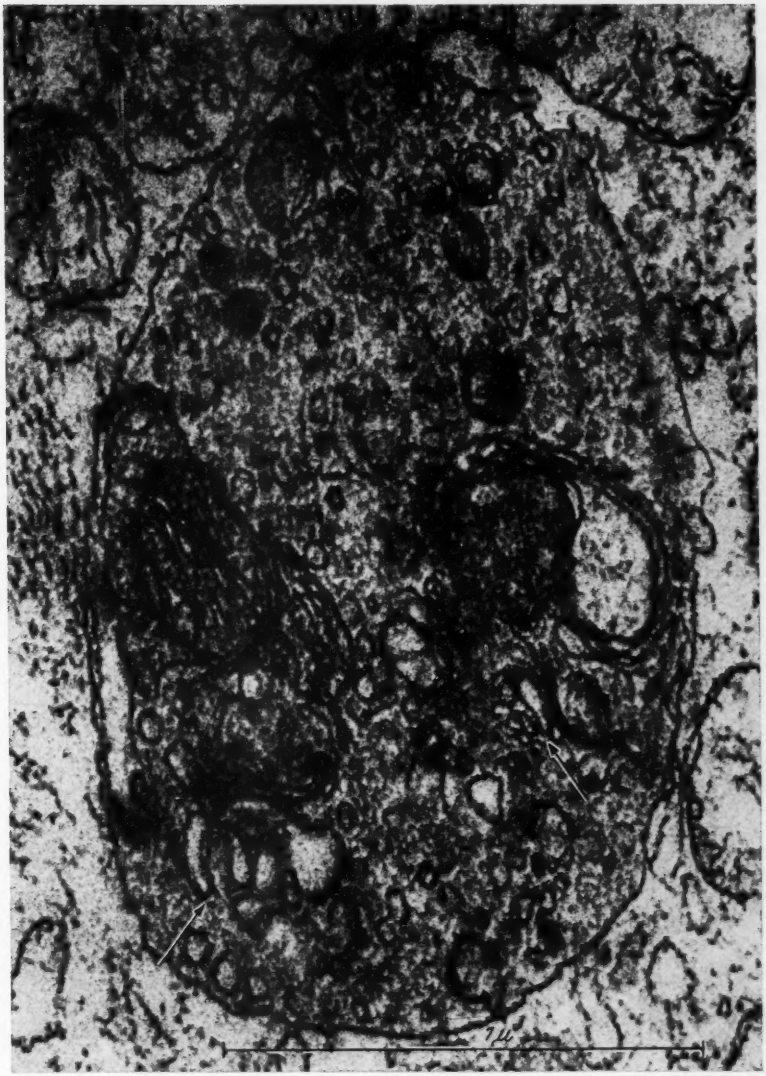


Abb. 7. „Reifes Cytosom" mit wenigen, ungeordneten Lamellensystemen. Das Cytosom enthält viele, 400—600 Å große Bläschen, die vermutlich Abschnürungsprodukte der Membranpaare sind (P f e i l e).

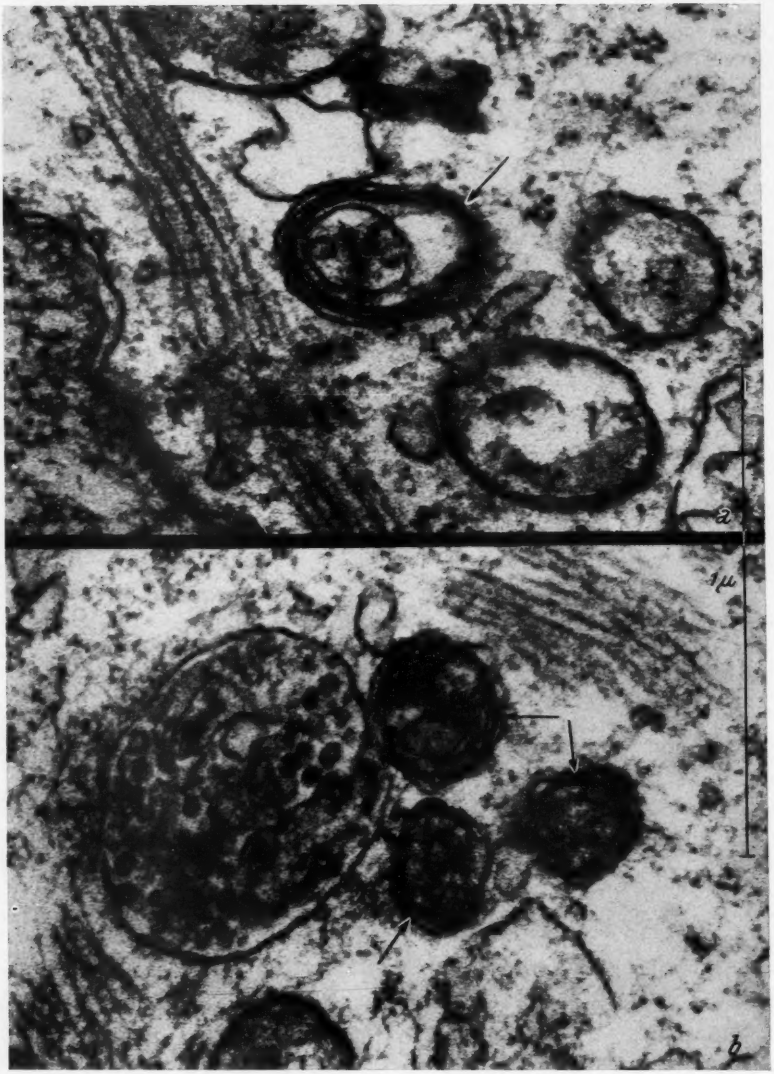


Abb. 8. Vier Plasmakörperchen mit wandständigem Lamellensystem (Pfeile in den Abb. 8 *a* und *b*) und ein einfach konturiertes Gebilde mit 400—600 Å großen Bläschen (linke Hälfte der Abb. 8 *b*). Es handelt sich wahrscheinlich um zwei verschiedenartige Zerfallsprodukte der „reifen Cytosomen".

Ähnlich verhält es sich mit gewissen, noch nicht näher bestimmten Polysacchariden, die mit dem Perjod-Schiff-Reagens (*PAS*) nach Hotchkiss in den Cytosomen, nicht aber in den Mitochondrien nachweisbar sind.

Aus den wenigen Angaben geht klar hervor, daß die Cytosomen sich in ihrer stofflichen Zusammensetzung von den Mitochondrien wesentlich unterscheiden, obwohl die mikromorphologischen Kriterien eindeutig für eine enge Verwandtschaft sprechen.

Da die Myoblasten nur *in vitro* Cytosomen ausbilden, muß noch die Frage erörtert werden, ob diese Gebilde fehlentwickelte und funktionslos gewordene Mitochondrien sind oder ob sie in den gezüchteten Zellen eine neue Aufgabe übernehmen. Eine endgültige Antwort hierauf kann noch nicht gegeben werden, doch sprechen mehrere Beobachtungen für die letztgenannte Annahme.

Füttert man die Myoblastenkulturen mit dem üblichen Nährmedium (siehe Material und Methoden), dann tritt in den Zellen eine bestimmte Anzahl von Cytosomen auf, die mehrere μ groß werden können. Bei einem Überangebot von Nahrung, insbesondere von Serum, steigt innerhalb weniger Stunden die Anzahl der Cytosomen so stark, daß die Zellen geradezu überschwemmt werden, ohne daß hierdurch ihre Lebensfähigkeit herabgesetzt wird. Umgekehrt findet man in Hungerkulturen, die das Wachstumsoptimum bei weitem nicht erreichen, so gut wie keine oder nur kleine Cytosomen, welche die Größe der Promitochondrien kaum überschreiten. Die Cytosomen reagieren also schnell und stark auf die Veränderung der Nahrung, vor allem des Serumangebotes. Ob und inwieweit hieraus Schlüsse auf die Funktion der Cytosomen gezogen werden können, soll nun in Verbindung mit den Ergebnissen anderer Autoren diskutiert werden.

Diskussion

Während der letzten Jahrzehnte wurden schon häufig Plasmakörperchen gefunden, die in ihren färberischen Eigenschaften bzw. ihrem Feinbau den Cytosomen entsprechen. Die Ansichten über ihre Herkunft, Entwicklung und Funktion gingen aber weit auseinander und haben ihnen die verschiedensten Namen eingetragen.

Die Cytosomen sind keine allgemeinen Bestandteile aller Zellen, kommen aber in Gewebekulturen fast immer vor und sind auch schon oft beschrieben worden. Die einschlägige Literatur findet man bei Tanaka (1933), Lasfarguès und Di Fine (1950), Gropp (1960), Wendt (1961). Außerdem liegen auch bereits einige elektronenmikroskopische Arbeiten über Cytosomen in gezüchteten Normal- und Tumorzellen vor (Bernhard, Bauer, Harel und Oberling 1954, Harford 1956, Lagerholm, Kjellén, Thorsson und Svedmyr 1957, Duncan und Hild 1960, Friedmann und Bird 1960). Aus allen diesen Arbeiten ergibt sich, daß die Cytosomen *in vitro* fast regelmäßig auftreten, *in vivo* aber nur ausnahmsweise. Für die Entstehung der Cytosomen müssen also die künstlichen Bedingungen der Gewebekultur verantwortlich gemacht werden.

Da die Ernährungsversuche von Gropp (1960) und auch meine eigenen gezeigt haben, daß die Cytosomen nur bei hohem Proteingehalt des Nähr-

mediums auftreten, dürfte ihre Entstehung auf einem Überangebot von Proteinen im Kulturmedium beruhen. Aus diesem Grunde hält Gropp die Cytosomen für Proteinspeicher, und ich schließe mich seiner Meinung an.

Das gelegentliche Vorkommen von Cytosomen *in vivo* wird von den betreffenden Autoren verschieden gedeutet.

1. Gewöhnlich wurden die Cytosomen mit resorptiven Vorgängen in Verbindung gebracht (Rhodin 1954, Stoeckenius 1957, Schulz 1958, Schiebler und Knoop 1959, Clark 1959, Mercer und Shaffer 1960).

2. Schulz und Paola (1958 und 1959) sind dagegen der Überzeugung, daß manche Cytosomen aus Kohlenhydrat-Protein-Komplexen und Phosphorlipoiden bestehen und für die Synthese der Mucopolysaccharide verantwortlich sind, speziell für Schleime. Diese Autoren halten die Cytosomen also für Zellsekrete bzw. deren Vorstufe.

3. Miller und Sitte (1955) sind schließlich der Meinung, die Cytosomen seien „das morphologische Substrat einer geordneten Vermehrung der Mitochondrienfermente bei erhöhter Beanspruchung", halten die Cytosomen also für Mitochondrien in Überfunktion. Wenn diese Hypothese richtig ist, müssen die Cytosomen alle Mitochondrienfermente in erhöhter Menge enthalten, doch ist ein Beweis hierfür noch nicht erbracht worden.

Zum Schluß seien der Vollständigkeit halber noch einige Arbeiten erwähnt, die von der Feinstruktur der Cytosomen handeln, auf die Funktion aber nicht eingehen, nämlich die Untersuchungen von Rhodin und Dalhamn (1956), Zetterquist (1956), Bloom, Friberg und Larsson (1956), Nilsson (1959 b), Hermann (1960), van Breemen und Montgomery (1960), Campiche (1960).

Zusammenfassung

Bei der Züchtung von embryonalen Hühnerherzmyoblasten entstehen innerhalb weniger Stunden aus den Promitochondrien, die sich *in vivo* zu regulären Fadenmitochondrien entwickeln, zunächst kleine Cytosomen von 1/3 bis ½ μ Durchmesser mit einem oder mehreren lamellären Innenkörpern. Innerhalb eines Tages können diese Cytosomen mehrere μ groß werden. Sie besitzen durchweg eine einfachkonturierte Außenhülle und mehrere Innenkörper, die sich aus Membransystemen zusammensetzen, deren dicht gepackte Lamellenpaare ganz ähnlich gebaut sind wie die *Cristae* der ausdifferenzierten Mitochondrien. Nach weiterer Reifung zerfallen diese Cytosomen in ihre Untereinheiten, über deren Schicksal noch keine näheren Angaben gemacht werden können. Dieser Vorgang wiederholt sich, so daß bei älteren Myoblastenkulturen alle Entwicklungsstadien der Cytosomen nebeneinander vorliegen.

Die Cytosomen sind herkunftsmäßig mit den Mitochondrien nahe verwandt, unterscheiden sich aber von ihnen hinsichtlich der stofflichen Zusammensetzung. Im Gegensatz zu den Mitochondrien sind die Cytosomen reich an Esterphosphatiden und Polysacchariden. Sie entstehen nur in solchen Kulturen, die ein proteinreiches Nährmedium enthalten. Ihre wichtigste

Funktion besteht wahrscheinlich darin, das in Gewebekultur überschüssig vorhandene Protein zu speichern oder zu spalten.

Literatur

Baker, J. R., 1944: The structure and chemical composition of the Golgi element. Quart. J. microsc. Science *85*, 1—72.

— 1959: VI. Towards a solution of the Golgi problem: Recent developments in cytochemistry and electron microscopy. J. roy. Micr. Soc. *77*, 116—129.

Belt, W. D., 1958: The origin of adrenal cortical mitochondria and liposomes: a preliminary report. J. Biophys. Biochem. Cytol. *4*, 337—340.

Bernhard, W., A. Bauer, J. Harel et Ch. Oberling, 1954: Les formes intracytoplasmiques du virus fibromateux de Shope. Bull. Cancer (Paris) *41*, 443—444.

Bernhard, W., and C. Rouiller, 1956: Close topographical relationship between mitochondria and ergastoplasm of liver cells in a definite phase of cellular activity. J. Biophys. Biochem. Cytol. *2*, 73—78.

Bloom, G., U. Friberg and B. Larsson, 1956: Some observations on the fine structure of mast cell tumours (Mastocytoma). Nord. Vet. Med. *8*, 43—55.

Breemen, V. L., van, and J. D. Montgomery, 1960: Ultrastructure of cytoplasmic „metasomes" found in renal proximal tubule cells. Norelco Reporter *7*, 7—12 und 18.

Campiche, M., 1960: Les inclusions lamellaires des cellules alvéolaires dans le poumon du Raton. J. Ultrastruct. Res. *3*, 302—312.

Chu, C. H. U., and C. A. Swinyard, 1956: Morphological and cytochemical identification of the Golgi apparatus. J. Biophys. Biochem. Cytol. *2*, 263—280.

Clark, S. L., 1959: Cellular differentiation in the kidney of newborn mice studied with the electron microscope. J. Biophys. Biochem. Cytol. *5*, 41—50.

Duncan, D., and W. Hild, 1960: Mitochondrial alterations in cultures of the central nervous system as observed with the electron microscope. Z. Zellforsch. *51*, 123—135.

Friedmann, I., and E. S. Bird, 1960: Pleomorphic cytoplasmic inclusion bodies in tissue cultures of the otocyst exposed to dimycin. Vierter intern. Kongr. f. Elektronenmikroskopie. Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 266—270.

Gropp, A., 1960: Untersuchungen an Zellen in der Gewebekultur als Beitrag zur Frage der Stoffaufnahme. Verh. dtsch. Ges. Path., *44*. Tag. München, 220—224.

Haguenau, F., 1960: Structure fine de cancers de la glande mammaire chez la femme. Vierter intern. Kongr. f. Elektronenmikroskopie. Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 462—466.

Harford, C. G., 1956: Globoid structures in the cytoplasm of rapidly growing Hela cells. J. Biophys. Biochem. Cytol. *2*, 347—350.

Herman, L., 1960: An electron microscope study of the salamander thyroid during hormonal stimulation. J. Biophys. Biochem. Cytol. *7*, 143—150.

Hirsch, G. C., 1939: Form- und Stoffwechsel der Golgi-Körper. Protoplasma-Monogr. *18*, Berlin.

Lagerholm, G., L. Kjellén, K. G. Thorsson and A. Svedmyr, 1957: Electron microscopy of Hela cells infected with agents of the adenovirus (APC-RI-ARD)-group. Arch. ges. Virusforsch. *7*, 221—241.

Lasfarguès, E., and J. Di Fine, 1950: Specific vital staining of the Golgi zone in tissue culture with azure B. Anat. Rec. *106*, 29—35.

Lipp, W., 1958: Histochemische Methoden. 18. Lieferung. Oldenbourg, München.

Mercer, E. H., and B. M. Shaffer, 1960: Electron microscopy of solitary and aggregated slime mould cells. J. Biophys. Biochem. Cytol. *7*, 353—356.

Miller, F., und H. Sitte, 1955: Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Mäusenieren nach intraperitonealen Eiweißgaben. Verh. dtsch. Ges. Path. *39*, 183—190.

Mollenhauer, H. H., and W. Zebrun, 1960: Permanganate fixation of the Golgi complex and other cytoplasmic structures of mammalian testes. J. Biophys. Biochem. Cytol. *8*, 761—775.

Monné, L., 1948: Function of the cytoplasm. Adv. Enzymology *8*, 1—69.

Nilsson, O., 1959 a: Ultrastructure of mouse uterine surface epithelium under different estrogenic influences. 4. Uterine secretion. J. Ultrastructure Res. *2*, 331—341.

— 1959 b: Ultrastructure of mouse uterine surface epithelium under different estrogenic influences. 5. Continuous administration of estrogen. J. Ultrastruct. Res. *2*, 342—351.

Rhodin, J., 1954: Correlation of ultrastructural organization and function in normal and experimentally changed proximal convoluted tubule cells of the mouse kidney. Godvil, Stockholm.

— and T. Dalhamn, 1956: Electron microscopy of the tracheal ciliated mucosa in rat. Z. Zellforsch. *44*, 345—412.

Schiebler, T. H., und A. Knoop, 1959: Histochemische und elektronenmikroskopische Untersuchungen an der Rattenplacenta. Z. Zellforsch. *50*, 494—552.

Schulz, H., 1958: Die submikroskopische Pathologie der Cytosomen in den Alveolarmakrophagen der Lunge. Beitr. path. Anat. *119*, 71—91.

— und D. De Paola, 1958: Delta-Cytomembranen und lamelläre Cytosomen. Z. Zellforsch. *49*, 125—141.

— 1959: Delta-Cytomembranen und ihre Beziehung zur Schleimsekretion. Klin. Wschr. *37*, 107—108.

Stoeckenius, W., 1957: Morphologische Beobachtungen beim intracellulären Erythrocytenabbau und der Eisenspeicherung in der Milz des Kaninchens. Klin. Wschr. *35*, 760—763.

Tanaka, H., 1933: Golgi apparatus vitally stained with nileblue sulfate. Arch. exper. Zellforsch. *13*, 47—52.

Weissenfels, N., 1958 a: Über die Entleerung und Entwicklung der Mitochondrien und den Feinbau des Cytoplasmas von embryonalen Zellen. Z. Naturforsch. *13 b*, 182—186.

— 1958 b: Über die Entstehung der Promitochondrien und ihre Entwicklung zu funktionstüchtigen Mitochondrien in den Zellen von Embryonal- und Tumorgewebe. Z. Naturforsch. *13 b*, 203—206.

— 1959 a: Golgi-Körper im phasenkontrast- und elektronenmikroskopischen Bild von Hühnerherzmyoblasten. Naturwiss. *46*, 233.

— 1959 b: Entstehung, Entwicklung und Feinbau der Golgi-Körper im Cytoplasma von Hühnerherzmyoblasten. Verh. dtsch. zool. Ges. 449—457.

— 1961: Der Einfluß der Gewebezüchtung auf die Morphologie der Hühnerherzmyoblasten. I. Die Transformation der Mitochondrien. Protoplasma *54*, 229—240.

Wendt, E., 1961: Die Wirkung der Röntgenstrahlen auf das Zentroplasma und die Cytosomen von Gewebekulturzellen. Z. f. Zellforsch. *53*, 172—184.

Zeiger, K., 1933: Morphologie des Cytoplasmas. Handb. der Pathol. *2/1*, 17—68. Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg.

Zetterquist, H., 1956: The ultrastructural organization of the columnar absorbing cells of the mouse jejunum. Godvil, Stockholm.

Anschrift des Verfassers: Priv.-Doz. Dr. Norbert Weissenfels, Zoologisches Institut der Universität Bonn, Bonn, Poppelsdorfer Schloß.

Nachweis von virusartigen Partikeln in Prosekretgranula von Speicheldrüsen der Pfirsichblattlaus *(Myzus persicae)*

Von

V. Moericke und **K. E. Wohlfarth-Bottermann**

Aus dem Institut für Pflanzenkrankheiten und dem Zentral-Laboratorium für angewandte Übermikroskopie am Zoologischen Institut der Universität Bonn

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 18. April 1961)

Bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen über die funktionelle Morphologie der Speicheldrüse der Pfirsichblattlaus, *Myzus persicae* Sulz. (Wohlfarth-Bottermann und Moericke 1959 und 1960; Moericke und Wohlfarth-Bottermann 1960a und 1960b, Moericke 1961) fanden wir bei solchen Tieren, die auf blattrollkranken Kartoffeln gelebt hatten, in einigen Fällen in den Vorstufen des Speichels, den Prosekretgranula, charakteristische Strukturen, die man als Viren ansprechen muß. Bekanntlich ist die Pfirsichblattlaus die Überträgerin des Blattrollvirus, des Erregers der Blattrollkrankheit der Kartoffel. Da bisher virusartige Strukturen — wenn man von der Notiz von Lanham (1952) absieht — in Aphiden elektronenmikroskopisch noch nicht dargestellt worden sind, erscheint eine Veröffentlichung unserer Befunde berechtigt, zumal der spezielle Ort des Auftretens und vielleicht auch der Ort der Bildung dieser Viruspartikel, nämlich die Prosekretgranula, besonders auffallend und bislang auch in anderen Drüsenzellen noch nicht beschrieben ist. Unsere Befunde sind insofern sowohl von phytopathologischem als auch von allgemein cytologischem Interesse.

Methode

Die Blattläuse (*Myzus persicae* Sulz.) lebten auf jungen, blattrollkranken Kartoffelpflanzen, die „wild" auf einem Komposthaufen (Mai 1960) wuchsen. Die Insekten wurden in einem Fixierungsgemisch von 1%igem Osmiumtetroxyd und 1%igem Kaliumbichromat (pH 6,9—7,2) geöffnet, die Speicheldrüsen herauspräpariert und diese über die Acetonreihe in Vestopal W eingebettet. Der 70%igen Acetonstufe war 1%ige Phosphorwolframsäure und 0,1% Uranylacetat beigefügt (Methode siehe Wohlfarth-Bottermann 1957). Ultramikrotom: Porter-Blum; Elektronenmikroskop: Siemens ÜM 100 d, 60 KV, Aperturblende 30 μ.

Für die technische Assistenz danken wir Frl. U. Baas, Frl. I. Kletschke und Herrn K. J. Medved, für die Bereitstellung der apparativen Hilfsmittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Befunde

Die Hauptdrüse von *Myzus persicae* wird nach Weber (1928) aus den Haupt- und den Deckzellen gebildet. Die Hauptzellen lassen sich im Elektronenmikroskop mit ihren herangereiften Prosekretgranula leicht an deren besonderer Struktur erkennen (Moericke und Wohlfarth-Bottermann 1960a). Im Bereich der Deckzellen, d. h. im proximalen Teil der Hauptdrüse, kann man in verschiedenen Zellen zwei verschiedenartige Prosekretgranula beobachten: Die einen haben nur eine geringe Dichte und Kontrastierung, wobei gleichzeitig in solchen Zellen Golgi-Strukturen sehr häufig sind (Wohlfarth-Bottermann und Moericke 1959); die anderen Prosekretgranula sind anscheinend im frühen Bildungsstadium stark kontrastiert (und dann von den Prosekretgranula der Hauptzellen schwer unterscheidbar). Im Zuge der Auflösung der zuletzt genannten Prosekretgranula besitzen diese nur noch eine stark kontrastierte „Kappe", der übrige Teil des noch deutlich umhüllten Granulums hat einen lockeren fädig-granulierten Aufbau (vgl. Abb. 1). Im Verlauf der weiteren Entwicklung löst sich auch die „Kappe" mehr und mehr auf (Abb. 2, *K*), bis schließlich das ganze, immer noch mit deutlicher Membran umhüllte Granulum nur noch die fädig-granuläre Struktur zeigt (Abb. 2, *PSG*). In früheren Untersuchungen (Wohlfarth-Bottermann und Moericke 1959) hatten wir in Anlehnung an die eingehende lichtmikroskopische Beschreibung der Speicheldrüsen der Blattläuse durch Weber (1928) angenommen, daß beide hier genannten Typen von Prosekretgranula in den Deckzellen der Hauptdrüse vorkommen und nur verschiedene Bildungs- bzw. Auflösungsstadien vorstellen. Neuerdings halten wir es aber für möglich, daß es sich hier um zwei verschiedene Zelltypen handelt, die eigentlichen Deckzellen mit den Golgi-Strukturen einerseits und die Zellen mit den „Kappenkugeln" als Prosekretgranula andererseits. Letztere Zellen

---

Abb. 1. Ausschnitt aus dem Cytoplasma einer Zentralzelle der Speicheldrüsen von *Myzus persicae* (Hauptdrüse). Das Übersichtsbild zeigt zahlreiche Prosekretgranula (*PSG*) mit den typischen Kappen (*K*). Die meisten Prosekretgranula enthalten virusartige Partikel, die im Schnitt verschieden getroffen sind: Die einfachen Pfeilmarkierungen weisen auf mehr oder weniger kreisrunde Anschnittsprofile hin, die Querschnitte von Stäbchen darstellen, wie das Vorkommen von Längs- bzw. Schrägschnitten (starke Pfeilmarkierungen) beweist. Bei *E* ungeordnete, vereinzelt liegende virusartige Partikel in einem Prosekretgranulum. *Typ I* der Einschlußpartikel. Elektronenoptisch 12.500 : 1; Endvergrößerung 43.500 : 1. Einblendung links unten: Starke Vergrößerung eines Prosekretgranulums mit Querschnitten der virusartigen Partikel (*Pfeilmarkierungen*). Bei den durch Pfeile markierten Partikeln ist zu erkennen, daß sich die Querschnittsprofile der Stäbchen vom Typ I aus einer relativ stark kontrastierten Hülle, einer schwachkontrastierten Ringzone und einem zentralen, kontrastreichen Innenkörper aufbauen. Elektronenoptisch 12.500 : 1; Endvergrößerung 131.000 : 1.

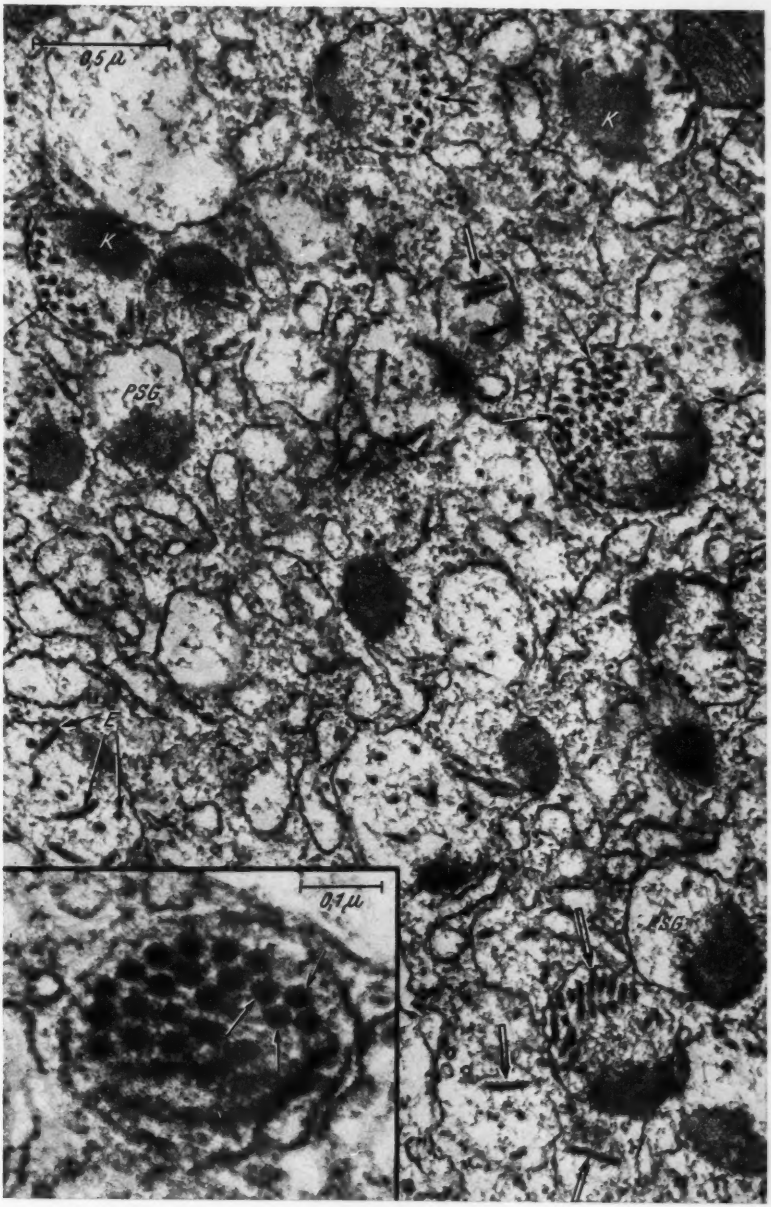


Abb. 1.

liegen zwischen den Deckzellen und den Hauptzellen. Möglicherweise gehen sie aus den von Toth (1936) beobachteten „Zentralzellen" hervor, die bei neugeborenen Larven verschiedener Aphiden gefunden wurden. Wir konnten nämlich an entsprechender Stelle sogar schon bei Embryonen von *Myzus* Zellen mit diesen typischen „Kappenkugeln" feststellen. Wir möchten diese Zellen deshalb vorläufig Zentralzellen nennen. Hier traten die jetzt zu beschreibenden virusartigen Strukturen auf.

Es fanden sich zwei verschiedene Typen von virusähnlichen Partikeln. Der erste Typ ist stäbchenförmig, ohne angeschwollene Enden. Der Durchmesser beträgt etwa 30, die Länge etwa 200 mμ. Der Körper dieses Typs ist als Ganzes kräftig kontrastiert. Bei starker Vergrößerung ließ sich jedoch vielfach eine stärker kontrastierte Hülle, darunter eine schwächer kontrastierte Ringzone und im Innern ein wiederum stark kontrastierter, zentraler Kern erkennen (vgl. Abb. 1, Einfügung, *Pfeile*). Die Stäbchen waren teilweise ziemlich regelmäßig angeordnet, so daß in einem Schnitt über 30 solcher Gebilde durchweg nur im Querschnitt oder im Längs- oder Schrägschnitt zu sehen waren. Allerdings gab es auch Stellen, wo die Stäbchen mehr einzeln und nicht geordnet lagen (Abb. 1, *E*). Die Formen des Typ I kamen ausschließlich im granulär-fädigen Teil der Prosekretgranula der Zentralzellen vor, und zwar in solchen, deren „Kappen" noch voll ausgebildet waren, also in einem frühen Auflösungsstadium. Innerhalb einer Zelle waren sie häufig, ja manchmal fast in jedem Prosekretgranulum im Schnitt anzutreffen. In einer Hauptdrüse waren mehrere, jedoch keineswegs alle Zentralzellen mit Stäbchen des Typ I gefüllt, so daß diese auf zahlreichen Schnitten quer durch die ganze Hauptdrüse beobachtet wurden. In einer anderen Drüse lag eine Zelle mit Stäbchen des Typs I neben einer solchen mit dem Typ II. Gemischtes Auftreten beider Typen in einer Zelle kam nicht vor.

Der zweite Typ war stäbchenförmig mit mindestens einem kugelig angeschwollenen Ende. Durch diese Anschwellung kann auf Querschnitten der Durchmesser verschieden sein. Dieser beträgt im mittleren Teil etwa 55 mμ, im kugeligen Endteil etwa 85 mμ. Die Länge, deren Messung in Dünnschnitten schwierig ist, dürfte zwischen 300 und 400 mμ liegen. Der Querschnitt erscheint nicht regelmäßig kreisrund, was zum Teil durch die Schnittführung bedingt ist, möglicherweise aber auch auf artefizielle Veränderung zurückzuführen sein mag.

Dieser zweite Typ besitzt eine stark kontrastierte äußere Hülle, die als Doppelmembran ausgebildet ist, was sich insbesondere an Schrägschnitten

Abb. 2. Ausschnitt aus dem Cytoplasma einer Zentralzelle der Speicheldrüsen von *Myzus persicae* (Hauptdrüse). Übersichtsbild über zahlreiche Prosekretgranula (*PSG*), deren Kappen (*K*) weitgehend aufgelöst sind. Virusartige Partikel von *Typ II* in vielen Prosekretgranula sowie in größeren Speicheltröpfchen (rechts oben im Bild). Die teilweise parakristalline Anordnung der Partikel ist besonders gut innerhalb des markierten Ausschnittes zu erkennen. Die einfache Pfeilmarkierung weist auf Querschnitte, die starke Pfeilmarkierung auf Längsschnitte hin. Der markierte Ausschnitt erscheint als Abb. 3 bei stärkerer Vergrößerung. Elektronenoptisch 6200 : 1; Endvergrößerung 25.000 : 1.

Abb. 2.

erkennen läßt (vgl. Abb. 2 und 3). Der innere Bau der Stäbchen erscheint im Querschnittsbild mehr oder weniger hell mit einer unregelmäßig verteilten Granulierung. Längsschnitte erweisen, daß der Innenraum aber nicht „leer", sondern mit einer als feinste Granula in Erscheinung tretenden Substanz gefüllt ist (Abb. 3, Längsschnitte).

Die Stäbchen liegen in den Prosekretgranula manchmal einzeln, häufig aber gebündelt zu mehreren oder gar zu vielen (bis über 30) parallel neben- und übereinander, so daß man von einer parakristallinen Anordnung sprechen kann. Eine solche Anordnung liegt bei festen Körpern vor, „deren Teilchen in einer Richtung einfach periodisch oder in einer Ebene zweifach periodisch angeordnet, in den übrigen Richtungen jedoch nur annähernd geordnet oder fast regellos verteilt sind".

Im typischen Fall fanden sich die Strukturen des Typ II ebenfalls in den Prosekretgranula der Zentralzellen, jedoch im Gegensatz zum Typ I in einem späteren Auflösungsstadium dieser Granula, wo die „Kappe" schon fast verschwunden ist (Abb. 2 und 3). Manchmal kann man in den Prosekretgranula nur einzelne Stäbchen finden (wobei es offenbleibt, ob auch in anderen Schnittebenen nur wenige solcher Gebilde vorhanden waren), oft waren es viele, die maximale Anzahl in einem Granulum einer Schnittebene betrug 31.

Gelegentlich findet sich dieser Typ auch in größeren, membranumhüllten Gebilden (Abb. 2, rechts oben), die vermutlich durch Zusammenfluß mehrerer Prosekretgranula entstanden sind und die man als Prosekrettröpfchen ansprechen kann (Moericke und Wohlfarth-Bottermann 1960 a).

In der „infizierten" Zelle waren die Stäbchen des Typ II überaus häufig. Die Mehrzahl der Prosekretgranula enthielt sie, so daß auf einem Zellausschnitt, der etwa einem Viertel des Querschnittes einer Zelle entsprach, gegen 500 Stäbchen dieses Typs gezählt werden konnten. In einer ganzen Hauptdrüse fanden wir nur 1—2 Zellen, deren Prosekretgranula diesen Typ von Einschlußkörpern enthielt.

Diskussion der Befunde

Daß es sich bei den aufgefundenen Gebilden um Viren handelt, dürfte sehr wahrscheinlich sein: Es sind Strukturen, die normalerweise nicht in den Drüsenzellen auftreten; schon in mehreren benachbarten Zentralzellen der gleichen Drüsen, erst recht in weit über 100 von uns im Laufe mehrerer Jahre untersuchten Zentralzellen anderer Speicheldrüsen von *Myzus persi-*

Abb. 3. Vergrößerung des in Abb. 2 markierten Ausschnittes, worin die Feinstruktur der virusartigen Einschlußkörper innerhalb der Prosekretgranula (*PSG*) erkennbar wird. *K* = Rest einer Kappe (vgl. Abb. 1). Die einfache Pfeilmarkierung weist auf Querschnitte und zeigt die stärker kontrastierte Wandung der Stäbchen, die starke Pfeilmarkierung zeigt Längs- bzw. Schrägschnitte einer Partikelgruppe. Die Anschnitte der Stäbchen ganz oben und ganz unten im Bild lassen erkennen, daß mindestens ein Ende der Stäbchen kugelig verdickt ist. Elektronenoptisch 6200 : 1; Endvergrößerung 60.000 : 1.

cae fehlten sie vollständig. Diese also mit Sicherheit anormalen und anscheinend zellfremden Strukturen haben die Form, Größe und Anordnung bekannter Viren. Man kann sie in dieser Hinsicht sowohl mit insekten- als auch mit pflanzenpathogenen, persistent übertragenen Viren vergleichen, so etwa mit dem Polyeder-Virus von *Bombyx mori* (Größe $279 \times 40\,m\mu$,

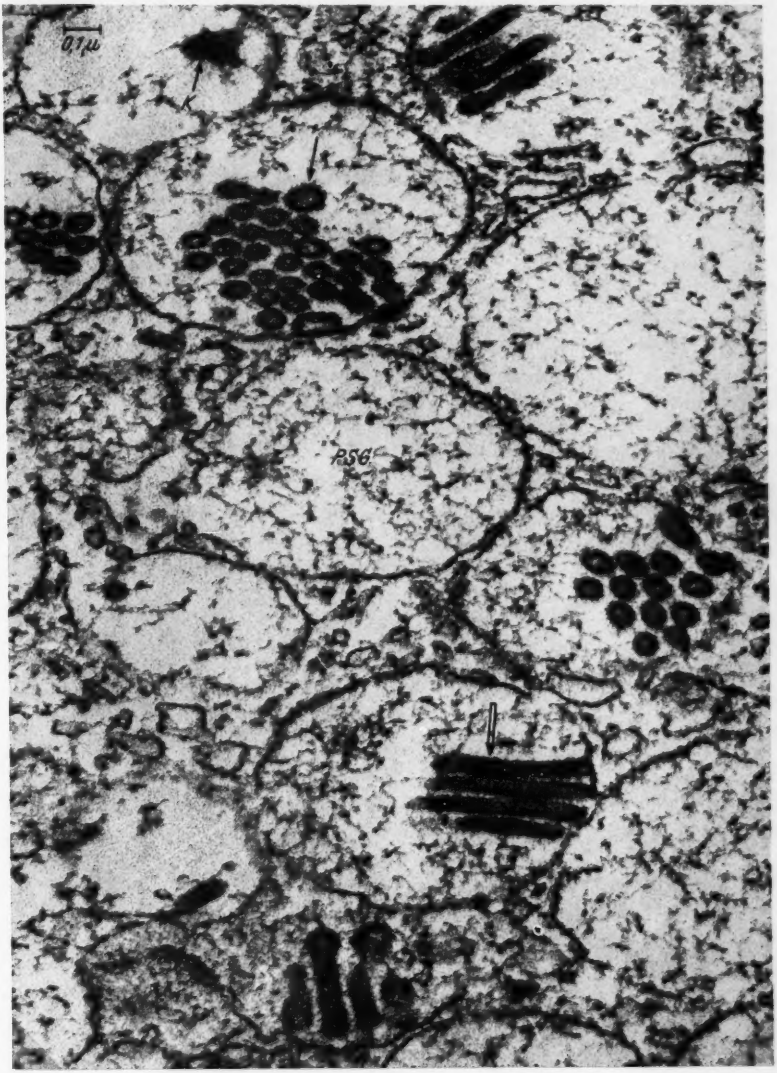


Abb. 3.

Bergold 1953) oder mit dem von Herold, Bergold und Weibel (1960) beschriebenen Maisvirus (Größe 242 × 48 mμ).

Es erscheint allerdings fraglich, ob die hier dargestellten Körper zu den typischen insektenpathogenen Viren gehören. Sie müßten dann zu den bisher wenig untersuchten Viren zu rechnen sein, die nicht in einer Proteinumhüllung eingelagert sind. An sich ist jedoch bei so ausgesprochenen Pflanzensaugern wie den Blattläusen die Existenz eines von Insekt zu Insekt übertragenen Virus wenig wahrscheinlich, da eine Infektion *per os* außerordentlich erschwert ist. So wird man eher an ein persistent übertragenes, phytopathogenes Virus denken. Ob es sich um das Blattrollvirus der Kartoffel handelt, läßt sich bis jetzt nicht entscheiden. Unter 13 Läusen, die auf blattrollkranken Kartoffeln gelebt hatten, fanden sich bisher nur zwei, in denen wir Viruspartikel in der beschriebenen Weise nachweisen konnten [1].

Ob die Stäbchen des Typ I eine Vorstufe zu denen des Typ II darstellen, läßt sich noch nicht mit Sicherheit sagen, dürfte aber wahrscheinlich sein. Ihre Bildung ginge dann gleichlaufend mit der Reifung und Auflösung der Prosekretgranula vor sich.

Über die Lokalisation von Viren als Einschlußkörper im Protoplasma liegt bereits eine erhebliche Literatur vor, die in diesem Rahmen nicht diskutiert werden soll. Insbesondere durch elektronenmikroskopische Untersuchungen konnten Viruspartikel sowohl einzeln im Grundcytoplasma als auch in membranumhüllten Blasen im Cytoplasma liegend nachgewiesen werden. In verschiedenen Zellen fand man auch Viruspartikel in den Innenräumen des Endoplasmatischen Retikulums und im Kern. Der Nachweis von Viruspartikeln in Sekretgranula von Drüsenzellen, speziell in Prosekretgranula von Speicheldrüsen ist unseres Wissens neu. Ein Vorkommen (und vielleicht auch die Vermehrung) von Viren in den Vorstufen des Speichels kann aber dann als besonders „zweckmäßig" oder gar „notwendig" angesehen werden, wenn es sich — wie hier zu vermuten — um Viren handelt, die mit dem Speichel auf die Wirtspflanze übertragen werden sollen (pflanzenpathogene Viren).

Eine Extrusion, d. h. die Wanderung der „reifen" Stäbchen als solche aus der Drüsenzelle in den Speichel hinein läßt sich recht schwer vorstellen. Zwar erscheint eine Einwanderung in die den Sekretkanal umgebenden Kanalzellen im Sinne eines Membranflusses möglich zu sein (Moericke und Wohlfarth-Bottermann 1960b); auch ist eine interzelluläre Wanderung im Bereich des den Kanal umgebenden „Faltenkranzes" noch denkbar; daß so große Gebilde aber die Kanalwandung der Ausführgänge der Speicheldrüse überwinden, kann man kaum annehmen. Es bliebe nur

[1] Anmerkung bei der Korrektur: Inzwischen wurden sechs Drüsen von Pfirsichläusen, deren Infektiosität für das Blattrollvirus auf Testpflanzen einzeln geprüft war, eingehend untersucht: In allen diesen Drüsen wurde der Typ I, dagegen nicht der Typ II gefunden, und zwar wiederum in den Prosekretgranula der Zentralzellen. Damit ist die Wahrscheinlichkeit, daß es sich bei den hier nachgewiesenen Körpern um das Blattrollvirus der Kartoffel handelt, stark erhöht.

der Weg über das distale, offene Ende des Kanals. (Ausführliche Diskussion über die möglichen Sekretableitungsmechanismen siehe bei Moericke und Wohlfarth-Bottermann 1960 b.) Wahrscheinlicher ist, daß es sich bei den beschriebenen Gebilden zwar um die Reife-, nicht aber um die Infektionsstadien handelt. Möglicherweise finden sich die Reifestadien der Viren allein im übertragenden Insekt, während die Stadien, die die Pflanze infizieren und in dieser ausschließlich vorkommen, wesentlich kleiner sind und damit ebenso wie das Speichelsekret die Kanalwandung passieren könnten.

Zusammenfassung

In zwei Speicheldrüsen der Pfirsichblattlaus *Myzus persicae* (Sulz.), die auf blattrollkranken Kartoffelpflanzen gesaugt hatten, fanden sich in mehreren Drüsenzellen Gebilde in zwei Typen, die man als Viren ansprechen kann. Typ I ist stäbchenförmig, etwa 30×200 mμ groß und durchweg stark kontrastiert oder mit einer schwach ausgebildeten Zonierung. Typ II ist stäbchenförmig mit mindestens einem kugelig angeschwollenen Ende. Der Durchmesser beträgt etwa 55 bzw. 85 mμ, die Länge dürfte im Bereich von 300 bis 400 mμ liegen. Dieser Typ besitzt eine doppelwandige, stark kontrastierte Hülle und einen weniger kontrastierten Innenraum. Beide Typen sind teilweise parakristallin angeordnet und finden sich in den Prosekretgranula der Zentralzellen der Speicheldrüse und zwar Typ I in frühen Auflösungsstadien, Typ II in fast aufgelösten oder aufgelösten Granula. Daß Typ II aus Typ I hervorgeht, ist wahrscheinlich. Es wird vermutet, daß es sich um ein phytopathogenes Virus handelt.

Literatur

Bergold, G. H., 1958: Viruses of Insects. In: Handb. Virusforsch. *4*, Hrg. v. C. Hallauer u. K. F. Meyer, Wien, S. 60—142.

Herold, F., G. H. Bergold, and J. Weibel, 1960: Isolation and Electron Microscopic Demonstration of a Virus infecting Corn (*Zea mays* L.). Virology *12*, 335—347.

Lanham, U. N., 1952: Observations on the supposed intracellular symbiotic microorganisms of Aphids. Science *115*, 459—460.

Moericke, V., 1961: Elektronenmikroskopische Untersuchungen an der Speicheldrüse von *Myzus persicae* (Sulz.). Proc. 4th Conf. Potato Virus Dis., Braunschweig 1960, p. 117—120. Veenman u. Zonen N. V., Wageningen.

— und K. E. Wohlfarth-Bottermann, 1960 a: Zur funktionellen Morphologie der Speicheldrüsen von Homopteren. I. Mitt. Die Hauptzellen der Hauptdrüse von *Myzus persicae* (Sulz.), *Aphididae*. Z. Zellforsch. *51*, 157—184.

— und K. E. Wohlfarth-Bottermann, 1960 b: Zur funktionellen Morphologie der Speicheldrüsen von Homopteren. IV. Mitt. Die Ausführgänge der Speicheldrüsen von *Myzus persicae* (Sulz.), *Aphididae*. Z. Zellforsch. *53*, 25—49.

Toth, L., 1936: Beiträge zur Kenntnis der Aphidenspeicheldrüse. Z. Morph. u. Ökol. Tiere *30*, 496—505.

Weber, H., 1928: Skelett, Muskulatur und Darm der schwarzen Blattlaus *Aphis fabae* (Scop.). Zoologica (Stuttgart) *28*, H. 76.

Wohlfarth-Bottermann, K. E., 1957: Die Kontrastierung tierischer Zellen und Gewebe im Rahmen ihrer elektronenmikroskopischen Untersuchung an ultradünnen Schnitten. Naturwiss. *44*, 287—288.

— und V. Moericke, 1959: Gesetzmäßiges Vorkommen cytoplasmatischer Lamellensysteme in Abhängigkeit vom Funktionsrhythmus einer Zelle. Z. Naturforsch. *14 b*, 446—450.

— — 1960: Zur funktionellen Morphologie der Speicheldrüsen von Homopteren. III. Mitteilung. Die Nebendrüse von *Myzus persicae* (Sulz.), *Aphididae*. Z. Zellforsch. *52*, 346—361.

Anschrift der Verfasser: Prof. Dr. V. Moericke, Institut für Pflanzenkrankheiten der Universität Bonn, Bonn, Nußallee. Doz. Dr. K. E. Wohlfarth-Bottermann, Zentral-Laboratorium für angew. Übermikroskopie der Universität Bonn, Bonn, Poppelsdorfer Schloß.

Electronmicroscope Studies on Ultrathin Sections of *Oscillatoria chalybea* Mertens[1]

By

William T. Hall and **George Claus**

Fordham University, Biological Laboratories, New York
Rheumatoid Diseases Study Group, New York University School of Medicine

With 18 Figures

(Received May 8, 1961)

Introduction

Since the investigations of Drawert [5] and Bringmann [1] several authors have dealt with the ultrastructure of the blue-green algae. Drews and Niklowitz in a series of papers [9, 10, 25, 26] succeeded in demonstrating the structure of the granular inclusions in the Cyanophycean cells, elucidating the difference between the granules of the chromato- and centroplasm. In their investigations on *Phormidium uncinatum* [9, 25] they were able to show the presence of a lamellar structure in the chromatoplasm analogous to the chloroplasts of higher plants, while their later studies [26] and those of others Gerola [17], Hagedorn [18, 19], Schinke and Ueda [27], Shatkin [29] confirmed the presence of this lamellar structure in other blue-green families of the *Hormogonales* order. Elbers et al. [11], Geitler [16] and Gerola [17] found similar structures in the unicellular *Cyanophyton Chroococcus*. In his paper Fuhs [13] suggested the presence of a lamellar structure throughout the entire cytoplasm of *Oscillatoria amoena*. He also supplied further information on the function of the cytoplasmic granules and gave additional evidence to the supposition of Geitler [15] that the crosswalls are double-layered, at least in the *Oscillatoriaceae*, and that they originate from the inner layers of the longwalls. Schultz [28] and one year later Drawert and Metzner [5, 6, 7, 8], showed that both the crosswalls and the longwalls at their junction with the crosswalls contain a series of pores probably present in a species specific manner. The latter further observed a thickening at the junction of the crosswall and longwall, which finding, however, has not been confirmed by other investigators. Schultz [28] described the sculpturing of the longwalls in a number of Hormogonales. Inspite of

[1] This investigation was supported in part by a grant—GF-12,616—from the U. S. Public Health Service, Division of General Medical Sciences.

all these studies, it is still not yet known how regular divisions and hormogonia formations occur among the *Oscillatoriae*. Though all the above authors provided some information about the ultrastructure of the *Cyanophyceae* much more investigation is required before an adequate picture is obtained. Therefore we undertook this study to clarify the process of cell divisions and hormogonia formation and to supply further data to that already known of the cytomorphology of the *Oscillatoriae*.

Material and Methods

Oscillatoria chalybea Mertens was cultured in a bacteria-free state in Bristol-soil water medium according to the description of Starr [30]. The algae were centrifuged at 500 rpm for ten minutes. After removal of the supernatant, the algae residue was fixed for fifteen minutes with 2% potassium permanganate and then dehydrated through a series of acetone solutions (10–50–70–90–100%). The material was then placed in propylene oxide for thirty minutes, after which it was transferred to a propylene oxide-Araldite (epoxy resin) mixture at a 1 : 1 concentration. This was left overnight in a desiccator. The resulting viscous material containing the algae was then transferred into the bottom of size no. 4 gelatin capsules and allowed to stand overnight in an oven kept at 58° C. The capsules were then filled with Araldite which was allowed to polymerize in the oven for at least three days. It was necessary to put the resin containing the algae in the bottom of the capsules in small amounts a day before filling the capsules entirely in order to keep the algae concentrated at one end, thus affording a suitable block. If the entire capsule was filled at once, the embedded material distributed itself throughout the Araldite. Sections were made on a Porter-Blum ultramicrotome and those falling within the silver-gold color range were used. The blocks were cut with a diamond blade and the sections floated off into 10% acetone solution. The sections were mounted on carbon coated grids and observed in the Siemens Elmiskop Ia and Philips EM 100 A electron microscopes.

Results

Cellwall: Since the investigations of Bringmann [21], it is known that the cellwalls of the *Oscillatoriaceae* are double-layered (cf. several figures). The outer layer of the longitudinal wall is continuous, while the

Plate 1

Fig. *A*: Part of a developed trichome. Double layered cell walls. *om.* = outer, continuous membrane; *im.* = inner membrane which forms the crosswall.—Fig. *B*: Young hormogonium. *iw.* = interwall; *ielv.* = interlamellar vacuoles; *ialv.* = intralamellar vacuoles; *mv.* = membraned vacuole-like cavity.—Fig. *C*: Young hormogonium, pores in walls, *c.* = diagonal canals in crosswall.—Fig. *D*: Section of the apical portion of a filament, lamellae irregular in thickness. Formation of new lamellae. Many small vacuoles in centroplasm. *iw.* = interwall; *p.* = pores in walls; *pb.* = polyphosphate bodies; *cb.* = cyanophycin bodies; *c.* = diagonal canals.—Fig. *E*: Initial phase of cell division. Irregularly bent shape of invaginating lamellae. *ielv.* = interlamellar vacuoles; *fb.* = "formed bodies" in centroplasm.

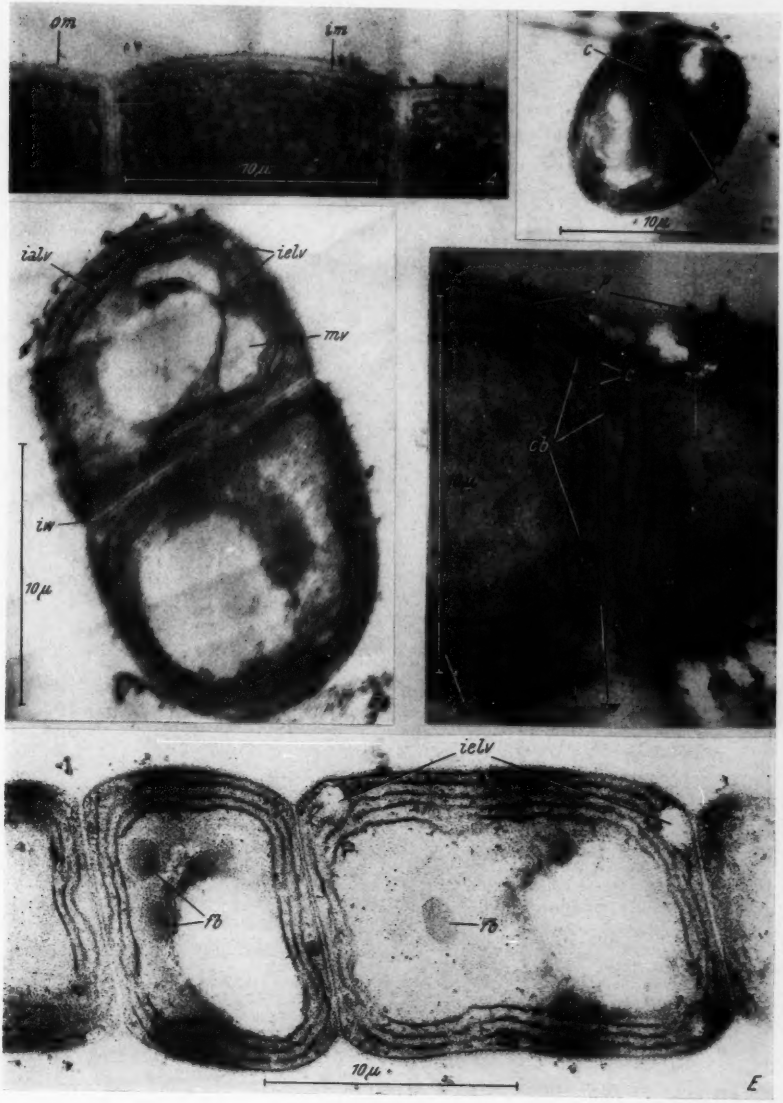


Plate 1[2]

[2] All figures represent longitudinal sections, if not otherwise indicated.

inner layer contributes to the formation of the crosswalls (Fig. A). On plexiglass preparations Fuhs [13] was able to find a third layer in the crosswall to which he makes no further allusion except a mention and thus apparently attributes to it no significance. This third layer was also observed by Hagedorn [18] who, however, interpreted its presence quite mistakenly (p. 430): "Die jüngsten Stadien des Kreisringes (namely the inwards growing parts of the inner layer of the longwall) sind bereits dreischichtig angelegt", which would appear to be *eo ipso* a morphological impossibility. A third layer appearing on Fuhs [13] photographs 4 and 5 parallel to the longwall is supposed to be the sheath of the filament. In our investigations, we have been unable to find a sheath in his sense; however we could confirm the well-known fact that the longwalls are comprised of an inner and outer layer. Most of the time in our work the outer layer of the wall becomes swollen or partially hydrolyzed (Fig. *N*, *O*) and this might form the so-called sheath visible in the light microscope. This outer layer runs continuously along the whole filament and the large amount of debris along the outer surface bespeaks its mucilaginous nature (Fig. *M*, *P*, *R*).

The membranes of the crosswalls are formed exclusively from the inner membranes of the longwall and thus are double formations. A third component between this double membrane also appears, as was stated above, and continues to the outer membrane of the longwall through the area between the two cross membranes (Fig. *B*, *D*). The membranes themselves of both long and crosswalls contain pores or canals running through them (Fig. *C*, *D*).

Formation of crosswall: In dividing filaments, invagination of the lamellar structure of the cytoplasm (Fig. *E*, *F*) is noticed at the initial site of the developing crosswall. Concurrent with this invagination, the inner membrane of the longwall also invaginates and progresses along the lamella towards the center of the cell in a direction perpendicular to the longwall. This diaphragm-like growth is actually double-layered. Its anterior portion (that most immediately approaching the center of the cell) being somewhat wedge-shaped is narrower than the posterior or basal end located at the longwall (Fig. *G*, *N*). After the ingrowth is completed at the center of the cell, the opposite portions of the ingrowing membranes fuse to form two complete, uninterrupted discs dividing the cell into two daughter cells (Fig. *N*). The space between the discs, at first narrower in the center, will become widened and ultimately uniform as the wall material (either pectin or cellulose or both) moves inwards from the longwall to fill up the area between the two membranes formed by the invaginated longwall-inner-membranes.

Through the area between the two membranes of the crosswall a third component arises and extends througout to the outer membrane of the longwall (Fig. *B*, *D*). Since it originates between the two membranes of the crosswall and, as will be suggested, shows similarities to the longwall, we call this formation the intermembranal wall or the interwall. This interwall appears as a definite double-layered structure (Fig. *H*), thus resembling the double membranes of the longwall.

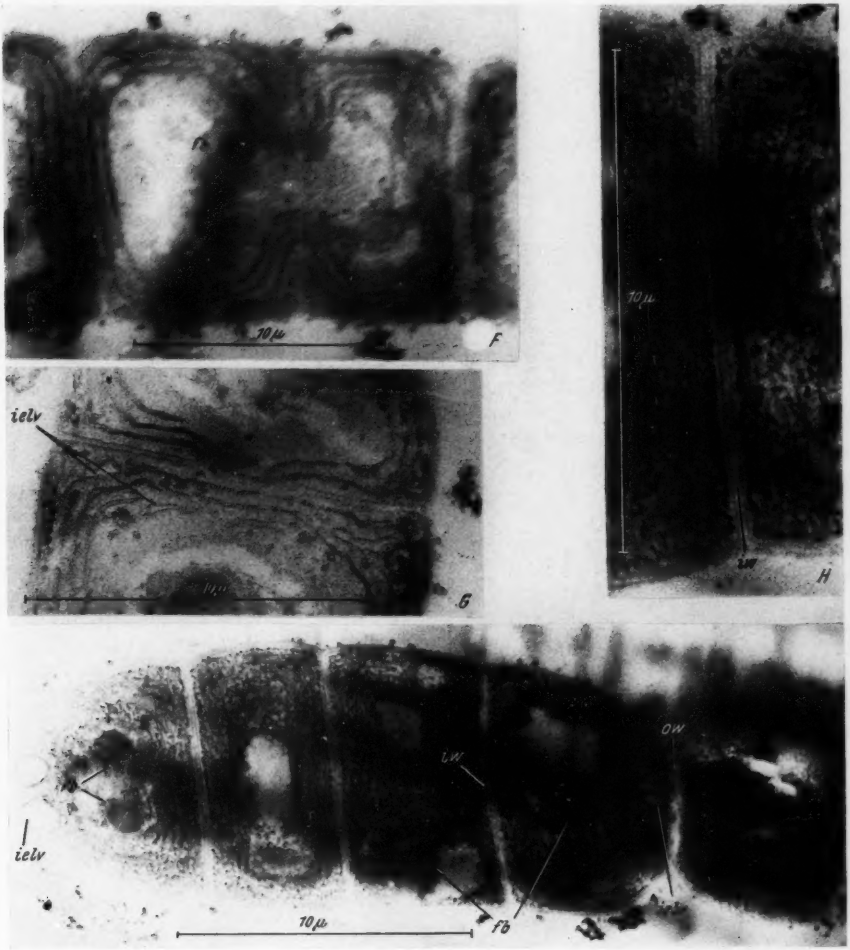


Plate 2

Fig. *F*: Acentric initiation of cell division. Irregularly bent shape of invaginating lamellae. *fb.* = "formed body" in centroplasm.—Fig. *G*: Double layered growth of crosswall. Irregularly bent shape of invaginating lamellae, showing elimination. Fusion of split lamellar ends, new lamella formation. *ialv.* = intralamellar vacuoles.—Fig. *H*: Double layered structure of interwall. *iw.* = interwall.—Fig. *I*: Filament in hormogonium formation. Newly formed outer membrane of end cell (from interwall). "Formed bodies" in division? *ielv.* = interlamellar vacuoles; *fb.* = "formed bodies"; *iw.* = interwall, doubly layered; *om.* = outer membrane.

In the past thirty years two theories have been advanced to explain the formation of the crosswall. Geitler [13] stated that the crosswall is built up exclusively from the inner membrane of the longwall, while the outer membrane plays no part. The crosswall is thus double-layered, being the product of an invagination (of the inner membrane). Mühldorf [23] proposed that the crosswall was a completely new formation arising as a product of cytoplasmic activity and capable of cleaving during hormogonium formation. Fuhs [13] endorses Geitler's opinion, but goes a step further by stating *a priori* that during hormogonium formation some of the cells of the filament die and the inner membranes of the crosswall of the dead cells become the outer membrane of the hormogonial end cells.

Actually none of these authors is completely correct. The truth seems to lie somewhere inbetween. Geitler is correct in stating that the inner wall invaginates to form a double membrane during regular cell division, but this explanation cannot be applied to hormogonium formation since it does not account for the origin of the new outer membrane of the end cells. Mühldorf is actually wrong in suggesting a neo-formation of the crosswall producing regular cell division, but seems to be correct in postulating the cleavage of the crosswalls in hormogonium formation.

The argument of Fuhs against the cleavage process that the crosswall even in well-developed cells is always thinner than the longwalls and if cleaved would become thinner is no argument at all. Observation does not indicate very great difference in the thickness of the cross- and langwalls in well-developed cells.

Hagedorn's [18] untenable opinion that the crosswalls are triple layered from the beginning of their development has already been mentioned. The interwall developes between the membranes of the crosswall only when the latter are complited.

In the case of hormogonium formation there is strong indication that the filaments break up by cleavage between the two membranes of the interwall. These membranes thus become the respective outer membranes of the wall of the newly formed end cells at the site of the previously existing crosswall (Fig. I). This explanation would eliminate the somewhat forced theory of Fuhs requirring the death of a cell intermediary between two nascent hormogonia.

Plate 3

Fig. *J*: Parallel lamellae in cross section. Irregularity in thickness of lamellae. *fb.* = "formed body".—Fig. *K*: Parallel lamellae in cross section. *mv.* = membraned vacuole-like cavities.—Fig. *L*: Young hormogonium after division. Irregularly bent shape of invaginating lamellae. "Formed body" in crosswall! *fb.* = "formed body", *ielb.* = interlamellar birdges.—Fig. M: Young hormogonium. Longvall hydrolysed, covered with debris. Lamellar elimination (reduction) along the crosswall. Structure of centroplasm. *ielv.* = interlamellar vacuoles.—Fig. *N*: Mature filament. cells in different stages of division. Acentric initiation of division. Hydrolysed longwall. Double layered growth of crosswall. Uninterrupted discs of developed crosswalls.

It may be possible that the interwall arises from the outer membrane of the longwall or might start its development from the center and grow towards the periphery. Further studies are necessary to clarify this point.

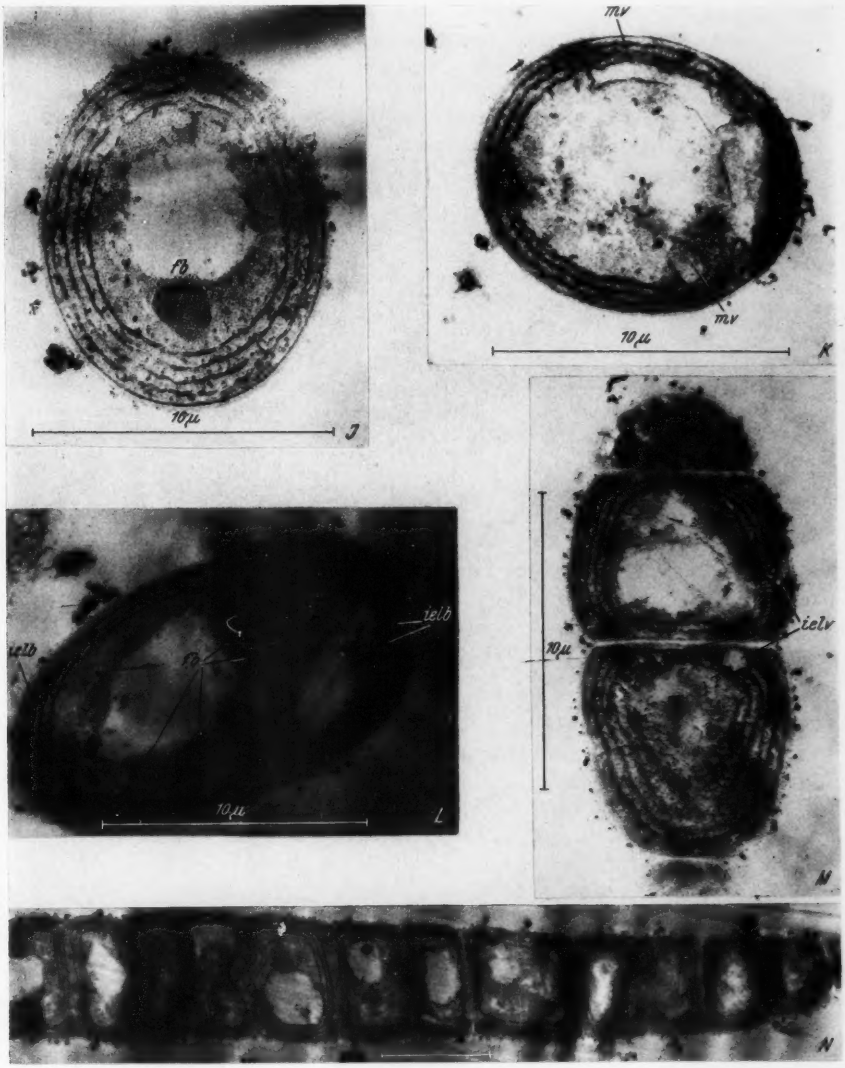


Plate 3

It was not possible to observe a cytoplasmic membrane (plasmalemma in sense of Hagedorn [19]) limiting the chromatoplasm and separating it from the cellwalls.

Chromatoplasm: All of the investigators agree that the chromatoplasm of the *Cyanophyceae* shows a lamellar structure. In the mature filament of *Oscillatoria chalybea* Mertens the usual number of lamellae is 3 to 6. In general, they run parallel to the cell walls and to each other and appear to be a uniform distance apart both in longitudinal (cf. several figures) and cross sections (Fig. *J, K*). Each lamella consists of a double membrane (cf. several figures) and shows an irregularity in thickness due to variations in the distance between these two membranes (Fig. *D, J, K*), since they do not run consistently parallel. The lamellae are confined to the outer portion of the cell and never appear in the centroplasm as was suggested by some authors in the cases of other species, e.g. *Phormidium frigidum, Ph. retzii, Oscillatoria limosa* and *O. amoena*. We could find no indication of regular thickenings of the lamellae as reported by Nikolowitz and Drews [26]. With the exception of Fig. 1 and 15, all of their pictures show marked distortions; especially Fig. 10–13 exhibit artifacts and can hardly be reliable.

Since we were able to observe the presence of small vacuoles (see later) between the two membranes of a single lamella (Fig. *G*), it seems to us a justifiable supposition that the lamellae are actually sites of enzymatic activity, both assimilatory and dissimilatory. Since in higher plants the vacuole contains dissimilatory products, this might also be the case here.

During cell division, as was mentioned previously, the lamellae invaginate concomitantly with the formation of the new crosswall. At this stage they assume a rather irregularly bent shape (Fig. *E, F, G, L*). Since the divisons appear not to be initiated at the geometrical middle of the longwall (Fig. *F, G*), the result is the formation of two unequal daughter cells. According to our materials the lamellae present in the smaller cell show a certain degree of elimination (Fig. *G, M, O*), most pronounced at the crosswalls. This interesting feature cannot be explained at present with any fact known about the cytology of the *Oscillatoriae*. One might speculate about the significance of this elimination process, but it seems better to await further evidence before drawing any conclusions. That these irregularly bent shapes of the lamellae along the crosswalls and the elimination of the lamellae in the smaller daughter cells are not artifacts can be shown by the regularity of the pattern and the bent lamellar structure exhibited by cells immediately after division.

Plate 4.

Fig. *O*: Mature filament. Cellwall hydrolysed. Lamellar elimination (reduction). Fusion of small vacuoles to big ones. *cb.* = cyanophycin bodies; *fb.* = "formed bodies"; *c.* = diagonal canals in crosswall.—Fig. *P*: Terminal portion of mature filament. Cellwall hydrolysed, covered with debris; *cb.* = cyanophycin bodies; *c.* = diagonal canals in longwall.—Fig. *Q*: Structure of centroplasm.—Fig. *R*: 4 "formed bodies" in a single cell surrounded with a fine halo. *fb.* = "formed bodies"; *h.* = halo.

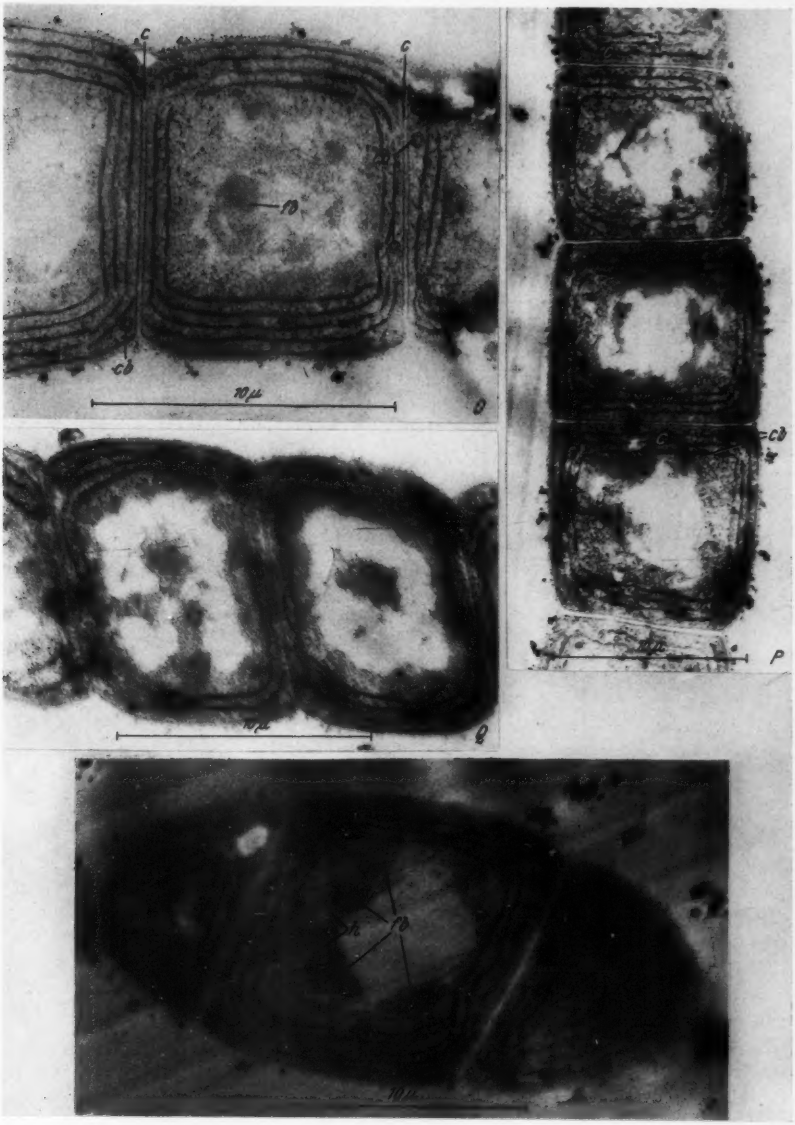


Plate 4

The bent structures are formed by the fusion of some of the invaginating and split lamellar ends (Fig. *G*). Some of the split ends, however, do not fuse, which accounts for the diminution of the lamellae along the newly formed crosswalls (Fig. *G, M, O*). In the later development of the daughter cells, these lamellae will be replaced by new formations (Fig. *D, G*) until they reach the number present along the longwall. This neo-formation, however, is not necessary before further cell divisions can take place.

The structure of the interlamellar space is rather undefined, but shows the presence of small granules which are either the bearers of the assimilatory pigments or sites of enzymatic synthesis as supposed by Fuhs [13]. These granules were not observed to be contiguous in forming chains as suggested by Hagedorn [18]. Even in his illustration (Fig. 1), the chains as described by him cannot be detected. The very small portion of a filament which he produces as evidence, is quite unconvincing and one is led to the conclusion that the marked distortions shown are nothing but artifacts. His Fig. 2 although somewhat more satisfactory still does not show the described granule-chains in the interlamellary space.

Polyphosphate bodies (Fig. *D, K*) were also observed, most frequently in the interlamellar spaces, but sometimes in that part of the centroplasm adjacent to the lamellae. Cyanophycin bodies (Fig. *D, O, P*) were observed, lying between the cell wall and the first lamella. These stain much lighter than the polyphosphate bodies and contain a layered structure. They are considered to be mitochondrial equivalents. Interlamellar bridges connecting the lamellae have been observed (Fig. *L*).

Vacuoles: Vacuoles occurring in the chromatoplasm are located in the interlamellar space or at the site where the lamellae abruptly end (Fig. *B, E, I, M*). The size of these vacuoles varies from the very small, which at times assume a position between two layers of the lamellae, to those which extend through three interlamellar spaces. However, even in this case these vacuoles are much smaller than those which occur in the centroplasm.

Specially defined plasmodesmata distinct from the pores of the crosswall were not observed, although some pictures indicated the presence of canals running diagonally through the crosswalls (Fig. *C, O*). Similar canals were also observed in the longwalls (Fig. *P*).

Centroplasm: In most cases the centers of the cells are partially filled up with an optically homogeneous material and very large vacuoles. The formation of the vacuole follows the usual pattern encountered in higher plants, whereby many small vacuoles combine to form a single large one (Fig. *C, G, O*). During this process of development the remainder of the original centroplasmic material is concentrated into compact areas by the action of the growing and fusing vacuoles. The shape of the developing vacuole would give strong indication that the centroplasmic material is not actually homogeneous, but must contain some kind of fibrillar or reticular structure (Fig. *M, P, Q*), probably in a semi-solid state, since it is able to withstand the force of the vacuoles and prevent them from assuming a

spherical shape. Such structures indicating the presence of reticulum are encountered frequently in growing cells.

A special type of vacuolization was observed in several different cases. It appeared as if the inner membrane of a lamella most adjacent to the centroplasm would be pushed toward the center of the cell, while the outer membrane retained its normal position, thus creating a membraned vacuole-like cavity (Fig. *B*, *K*). These may actually be extended structural parts of the lamellae. It is well known in the *Cyanophyceae* that the vacuoles do not possess their own special tonoplast, which partially explains why the cells show a different type of plasmolysis than that occurring in higher plants (Cholnoky [4], Kuchar [21]). We also were never able to find any specialized layer between the vacuole and the centroplasmic material.

Formed bodies in centroplasm: Very prominent bodies appear in the centroplasm of each cell (cf. several pictures). They usually assume a more or less ellipsoid shape. The maximum number observed in a single cell was four (Fig. *R*), but due to the different planes of sectioning it would be rare that all of them could appear in one section. They seem to be surrounded by a halo which would suggest interface reactions between the body and the adjacent centroplasmic material. In cases of extended vacuolization these bodies are still retained, but are pushed close to the chromatoplasm. There is some evidence that these bodies are able to undergo divisions (Fig. *I*). In some cells, two of them are located so close to each other that they appear actually to be fused. However, inspite of this condensed position a furrow-like structure seems to separate them. In a series of cells belonging to the same trichome but showing different stages of development judged by the general morphology of the cells, these "formed bodies" also show different pictures. The most obvious difference is observed in their location. Whereas in cells before division the "formed bodies" lie close to each other, in cells which have just completed division they are separated. If a cell reaches the resting stage, the separation of the "formed bodies" is apparently completed and they lie far away from each other. Whether or not their process of separation is due to their own active movement or is achieved by forces acting upon them cannot be stated as yet. However, analogies found in organisms of higher order (i. e. movement of chromosomes) would favor the latter possibility. In one single case, it seemed that one of these "formed bodies" occurred in the space between two cells. Since we lack further confirming material, we cannot state whether this phenomenon is a normal condition in passing genetic material from cell to cell or is the result of distortion (Fig. *L*). The structure and movement of the "formed bodies" would strongly indicate that they are the nuclei-equivalents and might be the bearers of the genic material. Since, however, neither their division or their fusion was established with certainty only further studies can give a positive solution to this fascinating problem.

It must be mentioned here, that staining with leuco-basic-fuchsin (Feulgen reaction) carried out on filaments of *Oscillatoria chalybea*

revealed the presence of 2–4 deeply coloured bodies in the cells which may be the same as those depicted with the electron microscope and thus they would really correspond to the nuclear equivalents.

Summary

Ultrathin sections of *Oscillatoria chalybea* Mertens investigated with the electron microscope disclosed the following:

1. The chromatoplasm shows a definite lamellated structure composed of three to six double-layered lamellae.

2. During cell division these lamellae invaginate and precede the invagination of the inner membrane of the longwall. Some of the lamellae fuse with those invaginating from the opposite direction and others remain split.

3. In certain cases the crosswalls show a third component called by us the interwall which is similar to the other walls in having a double membrane structure.

4. It is advanced that during hormogonium formation the cells split between the two membranes of the interwall and these membranes then form the missing part of the outer membrane of the newly formed end cells.

5. The chromatoplasm contains two types of granules: smaller ones in the interlamellar spaces and large ones between the walls and the first lamellae. These latter structured bodies are identical with the cyanophycin granules and might be mitochondrial equivalents. Polyphosphate bodies also occur.

6. Small vacuoles develop either in the interlamellar spaces or in the layers of the lamellae. Large vacuoles are confined to the centroplasm and are the result of the fusion of smaller ones. Only vacuoles developing in the layers of the lamellae show a formed limiting membrane.

7. The centroplasm apparently contains some kind of fibrillar or reticular structure since it is able to withstand the force of the vacuoles and prevent them from assuming a spherical shape.

8. Comparatively large, formed bodies are present in the centroplasm which are possibly capable of division and movement. These may be nuclear equivalents.

Acknowledgement

The authors would like to express sincere gratitude to Dr. Myron Ledbetter of the Rockefeller Institute for Medical Research for his advice concerning techniques and for making arrangements for the use of the electron microscopes.

Bibliography

[1] Bringmann, G., 1951 a: Vergleichende licht- und elektronen-optische Untersuchungen an Oscillatorien. Planta *38*, 541.

[2] — 1951 b: Über elektronenmikroskopische Feinstrukturen der Membranscheiden von Oscillatorien. Z. wiss. Mikrosk. *60*, 83.

[3] Bringmann, G., 1952: Die Organisation der Kernäquivalente der Spaltpflanzen unter Berücksichtigung elektronenmikroskopischer Befunde. Zbl. Bakteriol. *107*, 40.

[4] Cholnoky, B. J., 1937: Zur Kenntnis der Zyanophyzeenzelle. Protoplasma *28*, 524.

[5] Drawert, H., 1949: Zellmorphologische und zellphysiologische Studien an Cyanophyceen. Planta *37*, 161.

[6] — und I. Metzner, 1956: Zellmorphologische und zellphysiologische Studien an Cyanophyceen. III. Mitt.: Fluoreszenz und elektronenmikroskopische Beobachtungen an *Cylindrospermum* und einigen anderen Cyanophyceen. Ber. dtsch. bot. Ges. *69*, 291.

[7] — — 1958a: Zellmorphologische und zellphysiologische Studien an Cyanophyceen. V. Mitt.: Fluoreszenz und elektronenmikroskopische Untersuchungen an *Oscillatoria borneti* Zukal. Z. Bot. *46*, 16.

[8] — und I. Metzner-Küster, 1958b: Zellmorphologische und zellphysiologische Studien an Cyanophyceen. VI. Mitt.: Fluoreszenz- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an *Beggiatoa alba* und *Thiothrix nivea*. Arch. Mikrobiol. *31*, 422.

[9] Drews, G., und W. Niklowitz, 1956: Beiträge zur Cytologie der Blaualgen. II. Mitt.: Zentroplasma und granuläre Einschlüsse von *Phormidium uncinatum*. Arch. Mikrobiol. *24*, 147.

[10] — — 1956/1957: Beiträge zur Cytologie der Blaualgen. III. Mitt.: Untersuchungen über die granulären Einschlüsse der *Hormogonales*. Arch. Mikrobiol. *25*, 333.

[11] Elbers, P. F., K. Minnaert, and J. B. Thomas, 1957: Submicroscopic Structure of some Chloroplasts. Acta Bot. Néerl. *6*, 345.

[12] Fritsch, F. E., 1945: The Structure and Reproduction of the Algae. *2*, 768. Univ. Press Cambridge.

[13] Fuhs, G. W., 1958: Untersuchungen an Ultradünnschnitten von *Oscillatoria amoena* (Kütz.) Gomont. Protoplasma *49*, 523.

[14] — 1957/1958: Bau, Verhalten und Bedeutung der kernäquivalenten Strukturen bei *Oscillatoria amoena* (Kütz.) Gomont. Arch. Mikrobiol. *28*, 270.

[15] Geitler, L., 1932: Cyanophyceae in Rabenhorsts Kryptogamenflora *14*.

[16] — 1958: Lamelläre Struktur des Chromatoplasmas von Cyanophyceen in mikroskopischen Dimensionen und Baueigentümlichkeiten des Protoplasten von *Chroococcus turgidus*. Arch. Mikrobiol. *29*, 179.

[17] Gerola, F. M., 1959: Ricerche sull'infrastruttura di alcune Schizoficee di acquetermali. Accad. Naz. Linc., Ser. 8, 26 (4), 548.

[18] Hagedorn, H., 1960a: Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Blaualgen. Naturwiss. *47* (18), 430.

[19] — 1960b: Über das Plasmalemma einiger Mikroorganismen. Ber. dtsch. bot. Ges. *73*, 211.

[20] Hodge, A. J., J. D. McLean, and F. V. Mercer, 1956: A Possible Mechanism for the Morphogenesis of Lamellar Systems in Plant Cells. J. Bioph. Bioch. Cytol. *2*, 597.

[21] Kuchar, K., 1950: Plasmolyseformverlauf und Trichomzerfall bei zwei Oscillatorien. Phyton *2*, 213.

[22] Metzner, I., 1935: Zellmorphologische und zellphysiologische Studien an Cyanophyceen. II. Mitt.: Zur Chemie und zum submikroskopischen Aufbau der Zellwände, Scheiden und Gallerten von Cyanophyceen. Arch. Mikrobiol. *22*, 45.

[23] Mühldorf, A., 1938: Einige Betrachtungen zur Membranmorphologie der Blaualgen. Ber. dtsch. bot. Ges. *56*, 316.

[24] Niklowitz, W., und G. Drews, 1955: Zur elektronenmikroskopischen Darstellung der Feinstruktur von *Rhodospirillum rubrum*. Arch. Mikrobiol. *23*, 123.

[25] — — 1956: Beiträge zur Cytologie der Blaualgen. I. Mitt: Untersuchungen zur Substruktur von *Phormidium uncinatum* Gom. Arch. Mikrobiol. *24*, 134.

[26] — — 1957: Beiträge zur Cytologie der Blaualgen. IV. Mitt.: Vergleichende elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Substruktur einiger *Hormogonales*. Arch. Mikrobiol. *27*, 150.

[27] Schinke, N., and K. Ueda, 1957: A cytomorphological and cytochemical study of *Cyanophyta*. I. An electron microscope study of *Oscillatoria princeps*. Mem. Coll. Sci. Univ. Kyoto, Ser. B. *23*, 101.

[28] Schultz, G., 1953: Bewegungsstudien sowie elektronenmikroskopische Membranuntersuchungen an Cyanophyceen. Arch. Mikrobiol. *21*, 335.

[29] Shatkin, A. J., 1960: A Chlorophyll-containing Cell Fraction from the Blue-green Alga, *Anabaena variabilis*. J. Bioph. Bioch. Cytol. *7* (3), 583.

[30] Starr, R. C., 1956: Culture Collection of Algae at Indiana University. Lloydia *19*, 129.

[31] Tischer, I., 1957: Zellmorphologische und zellphysiologische Studien an Cyanophyceen. IV. Mitt.: Untersuchungen über die granulären Einschlüsse und das Reduktions-Oxydations-Vermögen der Cyanophyceen. Arch. Mikrobiol. *27*, 400.

[32] Ueda, K., 1957: Structure of Plant Cell with special reference to Lower Plants. II. Feulgen's Nucleal Staining in some Algae. Mem. Coll. Sci. Univ. Kyoto, Ser. B. *23*, 87.

[33] Zastrow, E. M., 1953: Über die Organisation der Cyanophyceenzelle. Arch. Mikrobiol. *19*, 174.

Anschrift der Verfasser: Dr. William T. Hall, Fordham University, Biological Laboratories, New York 58, N. Y. und Dr. George Claus, New York University School of Medicine, Department of Medicine, 550 First Avenue, New York 16, N. Y. (USA).

Über das Verhalten der Succinodehydrase in der normalen Nebenniere von Kaninchen und während der pharmakologischen Hypothermie

Von

J. Jonek[1]

Aus dem Histologisch-Embryologischen Institut der Universität Wien
(Vorstand Prof. Dr. A. Pischinger)

Mit 9 Textabbildungen

(Eingegangen am 25. Mai 1961)

Diese Arbeit ist eine Fortsetzung der früheren morphologischen und histochemischen Untersuchungen an Nebennieren von Kaninchen während der pharmakologischen Hypothermie (Jonek 6, 7, 8, 9, 10). Bisher wurde über das Verhalten von Lipoiden, Cholesterin, Plasmalen und Vitamin C berichtet. Um nun die Funktion der Nebenniere während der Unterkühlung besser kennenzulernen, war es nötig, die bisherigen morphologischen und histochemischen Befunde auch durch Enzymnachweise zu ergänzen. Außerdem habe ich es für zweckmäßig gefunden, das Verhalten eines Wasserstoffdonators vom technischen und histochemischen Standpunkt in der normalen Nebenniere zu untersuchen, da die bisherigen Ergebnisse nur spärlich sind. Es wäre von großer Bedeutung, wenn man aus den Reaktionen in der Nebennierenrinde Rückschlüsse auf die Aktivität des Organes ziehen könnte. Succinodehydrase ist ein mit dem Zytochrom verknüpftes, wasserstoffübertragendes Enzym. Sie wurde von anderen Autoren auch Bernsteinsäuredehydrase oder Zytochromotrophe-Dehydrase genannt. Die Succinodehydrase spielt eine vitale Rolle in den Atmungsprozessen der meisten lebenden Zellen und katalysiert ein Glied in den Reaktionsketten zur Oxydation der Fette, Kohlehydrate und Proteine. Die Dehydrierung von Bernsteinsäure zur Fumarsäure ersieht man aus der chemischen Formel:

$$HOOC—CH_2—CH_2—COOH \overset{-H_2}{\underset{+H_2}{\rightleftarrows}} HOOC—CH=CH—COOH.$$

[1] Die Arbeit wurde zur Zeit eines Stipendiumaufenthaltes vom Polnischen Gesundheitsministerium im Histologisch-Embryologischen Institut der Universität in Wien durchgeführt. Herrn Prof. A. Pischinger danke ich für die Ermöglichung der Untersuchungen und die Beratung in seinem Institut.

Material und Methoden

Als Untersuchungsmaterial dienten Kaninchen (Weibchen), die in folgende Gruppen eingeteilt wurden. Zur Kontrollgruppe I gehörten drei Kaninchen. Gruppe II enthielt vier Kaninchen, denen Largactil 5 mg auf 1 kg Körpergewicht (Kgw.), Phenergan 10 mg auf 1 kg Kgw., Dolantin 10 mg auf 1 kg Kgw. intramuskulär injiziert wurden. Nachher wurden die Tiere 6 Stunden unterkühlt, die Körpertemperatur sank bis zu $+20^0$ Celsius ab. Gruppe III enthielt drei Kaninchen, bei denen 6 Stunden täglich über 7 Tage, ähnlich wie in Gruppe II, die pharmakologische Hypothermie ausgeführt wurde. Nach Beendigung des Experimentes wurden die Tiere durch Dekapitation getötet und die Nebennieren sofort im frischen Zustand mit den oben beschriebenen Methoden untersucht. Zum Vergleich wurden auch zwei Kaninchen in der Äthernarkose getötet. Außerdem wurde vor und nach dem Experiment das Blut auf oxydoreduktive Systeme (ungesättigte Fettsäuren und anderes) nach der von A. Pischinger [14, 15] angegebenen jodometrischen Methode untersucht: Verdünnen des nichthämolytischen Serums mit Methanol p. a. 1 : 5 Klarzentrifugieren, Vorgabe von JBr in Eisessig. Nach ½ Stunde Stehen im Dunklen mit Na-thiosulfat unter Stärke rücktitrieren und Berechnung der verbrauchten Jodmenge. (Nähere Angaben siehe im Original.)

Zum Succinodehydrasenachweis in der Nebennierenrinde von Kaninchen wurde mit zwei Methoden gearbeitet: Erstens mit der klassischen Methylenblautechnik (W. E. Semeneff 1935). Das Prinzip der Methode beruht darauf, daß Natriumsuccinat als Substrat für das Enzym und als Indikator Methylenblau dient. Succinodehydrase überträgt Wasserstoff vom Substrat auf den Wasserstoffakzeptor Methylenblau, das dadurch zur farblosen Leukoform reduziert wird. Diese Methode hat hier vor allem zum Vergleich mit dem zweiten Succinodehydrasenachweis nach A. M. Seligmann und A. M. Rutenburg 1951 gedient. Die Verwendung von Tetrazoliumsalzen als Indikator ermöglicht die genaue intrazelluläre Lokalisation der Succinodehydraseaktivität. Bei dieser Methode wurde ein rotes Tetrazolium verwendet (T.T.C., 2-3-5-Triphenyltetrazoliumchlorid). Durchführung unter aeroben Bedingungen:

1. Einfrieren von Gewebsstücken ohne Wasserzusatz im eigenen Saft, Anfertigen von 20 bis 100 μ dicken Gefrierschnitten im Kryostaten.

2. Schnitte in folgendes Inkubationsmedium einlegen: Gleiche Teile wäßriger Lösung von 0,1%igem rotem Tetrazolium, 0,2%iges Natriumsuccinat (3,24 g $C_4H_4O_4Na_2$ auf 100 ml), 0,1-m-Phosphatpuffer, pH 7,6, dest. Wasser.

3. Schnitte in 0,85%iger Kochsalzlösung waschen.

4. In 10%igem Formol härten, 30 Min.

5. In Glyzerin-Gelatine einbetten.

Zur besseren zytologischen Beurteilung wurden nach dem Härten in Formol 100 μ dicke Schnitte nochmals im Kryostaten zu 10 μ dicken Prä-

paraten geschnitten. Die färberische Darstellung der Succinodehydrase beruht darauf, daß das farblose Tetrazoliumsalz durch die Succinodehydraseaktivität zum rotgefärbten, unlöslichen Formazan reduziert wird.

Befunde

Gruppe I: Die normale Nebenniere der Kaninchen.

Die Bernsteinsäureaktivität ist in den Nebennieren durch eine intrazelluläre Ablagerung des Formazan angezeigt. Die vollständige Reduktion des roten Tetrazoliums zu Formazanen entspricht den Orten höchster Enzymaktivität. Bei den Kontrolltieren sieht man eine diffuse intrazelluläre Verteilung des TTC in der Zona arcuata, Zona fasciculata und Zona reti-

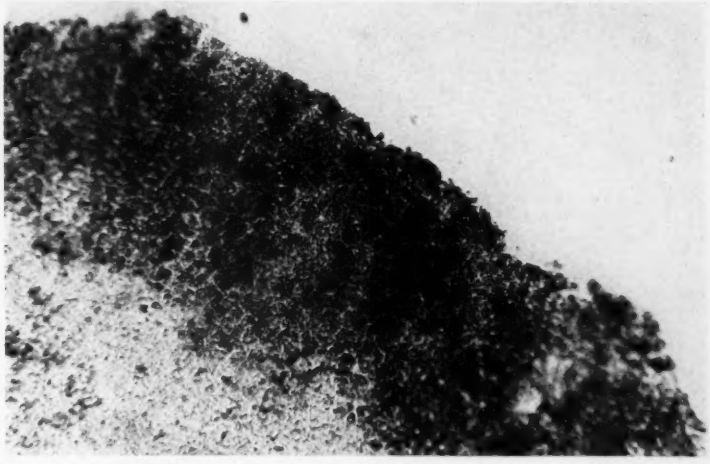


Abb. 1. Nebennierenrinde aus der Kontrollgruppe (Kaninchenweibchen). Succinodehydraseaktivität in der Zona arcuata und äußeren Fasciculata. Vergr. 100 : 1.

cularis (Abb. 1, 2 und 3). Die Reduktion des TTC in den Nebennieren wird nur selten durch intrazelluläre Ablagerung eines roten granulären Pigmentes oder Kristalle angezeigt, wie es z. B. in der Leber die Regel ist. Das Formazan ist fast nur in den Lipoidtröpfchen des Cytoplasmas enthalten. Nur bei hoher Enzymaktivität sieht man Kristallablagerungen (Abb. 4). Die höchste Enzymaktivität entspricht dem inneren Teil der Zona arcuata und dem äußeren Teil der Fasciculata. In der äußeren Schichte der Zona arcuata sieht man nur gelegentlich mehr oder weniger große Formazanablagerungen. Von der Innenschicht der Zona arcuata erstreckt sich eine starke Formazanreaktion in den äußeren Teil der Zona fasciculata, die im inneren Teil immer schwächer wird und dort schließlich ausbleibt. In der Zona reticularis ist die Reaktion im Vergleich zu anderen Schichten sehr schwach und nur vereinzelt findet man extrazellulär Formazankristalle. Die Formazanablagerung in der Nebennierenrinde ist im allgemeinen nicht

gleichmäßig über die ganze Breite der Rinde verteilt. Es kommt manchmal zu streifenförmigen oder selten zu fleckförmigen Formazanablagerungen.

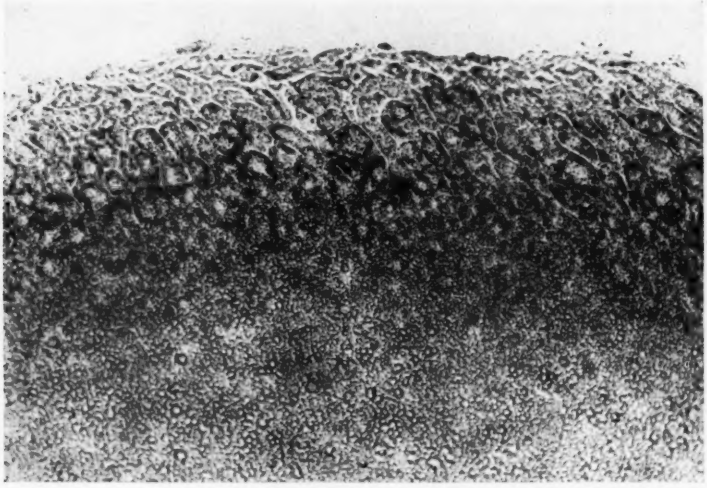


Abb. 2. Diffuse Succinodehydraseaktivität in der Nebennierenrinde von Kaninchenweibchen aus der Kontrollgruppe. Vergr. 100 : 1.

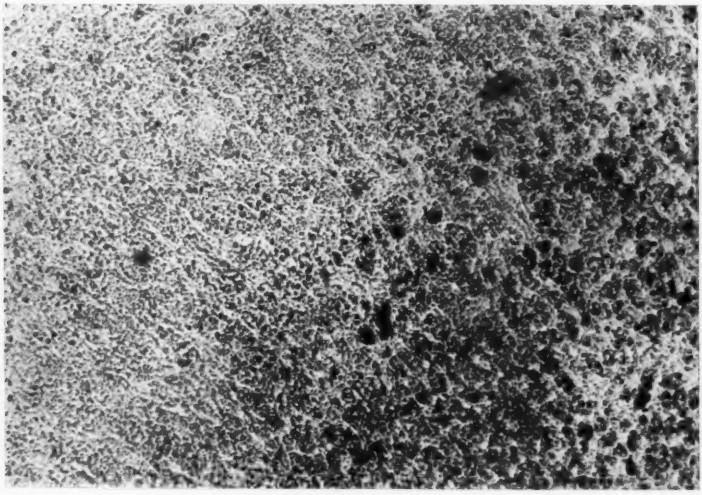


Abb. 3. Succinodehydraseaktivität in der Nebennierenrinde von Kaninchenweibchen aus der Kontrollgruppe. Zona reticularis. Vergr. 100 : 1.

Diese verschiedene Enzymaktivität weist auf eine Dynamik der Nebennierenrinde hin, die offenbar weitgehend mit dem Verhalten der Succino-

dehydrase zusammenhängt. Das Mark ist vollkommen frei von histochemisch darstellbarer Bernsteinsäureaktivität.

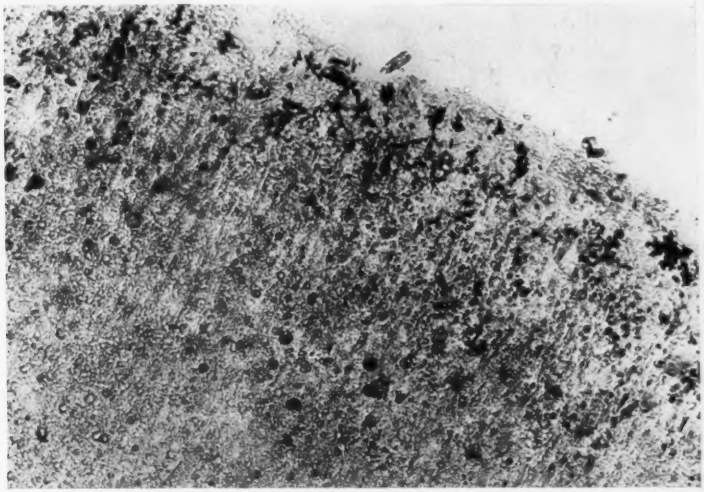


Abb. 4. Formazankristalle in der Nebennierenrinde von Kaninchenweibchen aus der Kontrollgruppe. Vergr. 100 : 1.

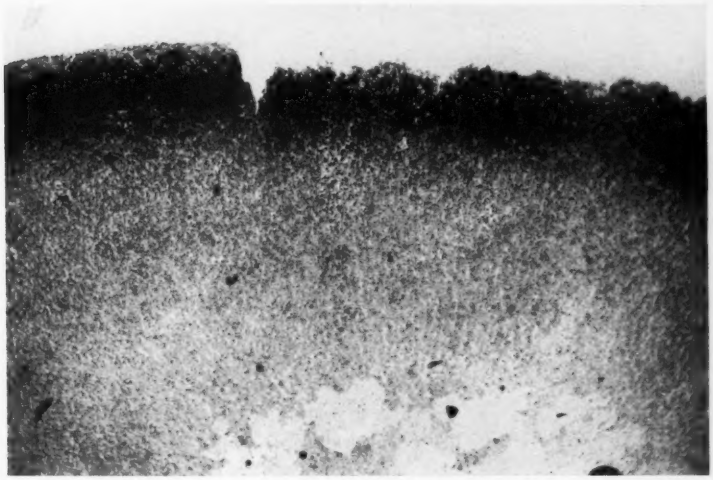


Abb. 5. Succinodehydraseaktivität in der Nebennierenrinde von Kaninchenweibchen nach sechsstündiger pharmakologischer Hypothermie. Vergr. 30 : 1.

Gruppe II: In der Zona arcuata der Nebennierenrinde der Kaninchen dieser Gruppe kommt es zu starken Formazanablagerungen in Form

von intra- und extrazellulären Kristallen (Abb. 5 und 6). Alle Drüsenzellen zeigen eine diffus verteilte Formazanablagerung in Form feiner intrazellulärer Granula oder Kristalle kranzförmig an der Zellmembran. An Stellen starker Enzymaktivität kommt es sogar zu großen extrazellulären Kristallansammlungen. Weiter sieht man hier vereinzelt Zellen, die im Vergleich zu den eben beschriebenen eine noch wesentlich stärkere Enzymaktivität aufweisen. In Richtung der Zona fasciculata nimmt die Reaktion

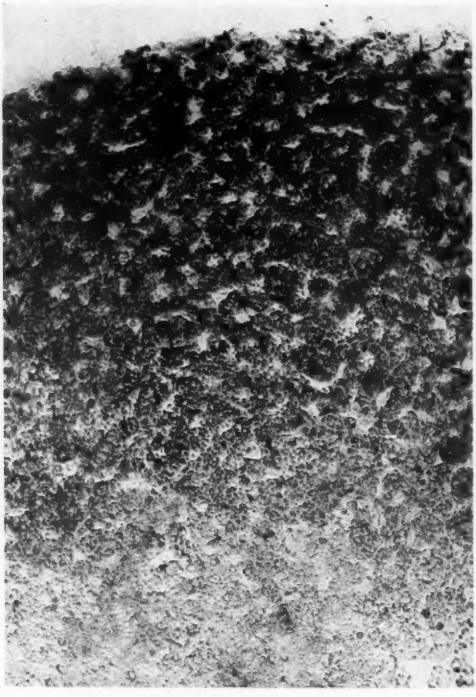


Abb. 6. Nebennierenrinde von Kaninchenweibchen. Formazanablagerungen in Form von intra- und extrazellulären Kristallen in der Zona arcuata. Vergr. 120 : 1.

immer mehr ab und verbleicht schließlich ganz. Die Zona fasciculata ist mit Ausnahme des äußeren Teiles der Außenzone praktisch frei von Succinodehydrase. In der Übergangszone von Arcuata zur Fasciculata sieht man in den Nebennieren von Kaninchen kein Abblassen der Reaktion, anders wie es bei den Ratten beschrieben wurde [23]. Die Enzymaktivität in der Zona arcuata zeigt bei den einzelnen Versuchskaninchen in den Nebennieren graduelle Unterschiede (Abb. 7). Sogar in den einzelnen Schnitten kann es zu merkbaren Intensivitätsschwankungen kommen. In der Zona reticularis ist die Enzymreaktion schwach und manchmal gar nicht zu sehen.

Es kommt ähnlich wie in der Zona fasciculata zu einer beträchtlichen Verminderung der Enzymaktivität gegenüber der Norm. Im Mark wurde niemals eine positive Reaktion gesehen. Nur vereinzelt beobachtet man hier und da Inseln mit einer schwachen Reaktion, die jedoch aus ektopischen Rindenzellen zu bestehen scheinen. Die Bezirke der mit der Methylenblaumethode bestimmten Enzymreaktion sind im allgemeinen ähnlich verteilt wie jene der Formazanablagerung.

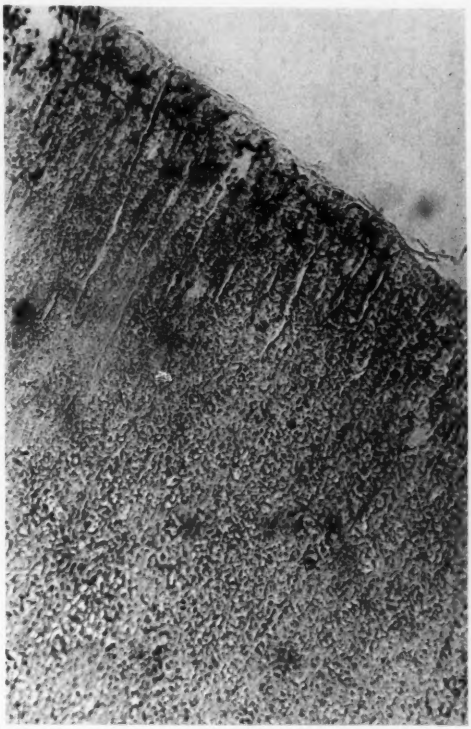


Abb. 7. Succinodehydraseaktivität in der Nebennierenrinde von Kaninchenweibchen nach sechsstündiger pharmakologischer Hypothermie. Vergr. 100 : 1.

Gruppe III: In dieser Gruppe wurden die Kaninchen 7 Tage der pharmakologischen Hypothermie ausgesetzt. Die Körpertemperatur wurde durch eine Cocktail-Mischung und entsprechende Außentemperatur bis zu $+20^0$ C herabgesetzt. Die Tiere überstanden das Experiment im allgemeinen gut. Die Körpertemperatur und der Blutdruck regelte sich bei Zimmertemperatur wieder von selbst. Nur am dritten Tag des Experimentes mußten zwei Kaninchen künstlich erwärmt werden; danach kam es wieder zu einer selbstständigen Temperatur- und Blutdruckregelung. Am siebenten Tag wurden die Tiere getötet und die Nebennieren sofort histochemisch

untersucht. Eine starke Enzymreaktion beobachtet man in der Zona arcuata und reticularis (Abb. 8). Die ganze Fasciculata ist frei von histochemisch

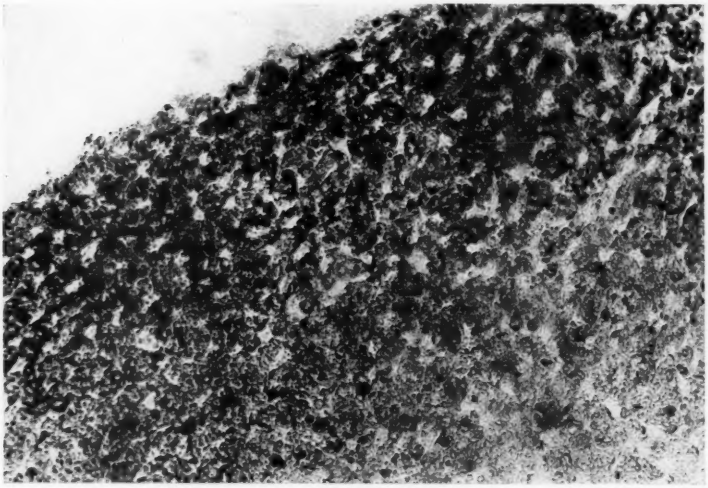


Abb. 8. Nebennierenrinde von Kaninchenweibchen. Enzymreaktion in der Zona arcuata nach siebentägiger pharmakologischer Hibernation. Vergr. 120 : 1.

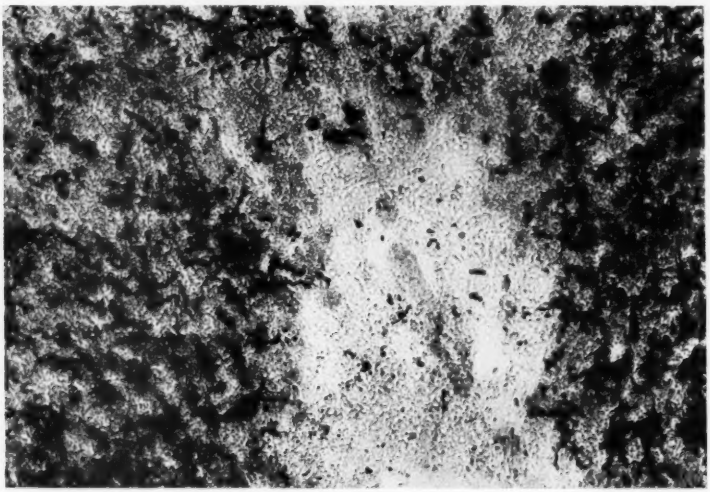


Abb. 9. Nebennierenrinde von Kaninchenweibchen nach 7 Tagen pharmakologischer Hypothermie. Enzymaktivität in der Zona reticularis. Vergr. 120 : 1.

darstellbarer Enzymaktivität. In der Zona arcuata kommt es zu starken intra- und extrazellulären Formazanablagerungen. Die Größe der Kristalle

ist in verschiedenen Schnitten unterschiedlich. Die Reaktion ist diffus, kann jedoch in den einzelnen Zellen verschieden stark sein.

Ähnlich wie in der Zona arcuata sieht man eine sehr starke Reaktion in der Zona reticularis (Abb. 9). Es kommt zu sehr starken extrazellulären Kristallablagerungen. Auch hier beobachtet man in allen Zellen eine diffuse Reaktion, die in einigen Zellen besonders stark auffällt. Einige Schnitte zeigen auch eine schwache Reaktion in der inneren Fasciculata. Die Inseln von Rindenzellen im Mark der Nebenniere zeigen eine starke Enzymreaktion. Im Mark wurde auch eine schwache Enzymaktivität bemerkt. Diese Beobachtungen müßten jedoch im chronischen Experiment noch weiter untersucht werden. Mit der Methylenblaumethode wurde gleichfalls eine sehr starke Bernsteinsäureaktivität in der Zona arcuata und reticularis beobachtet. In der Zona fasciculata und im Mark bleibt hingegen das Abblassen aus.

Die jodometrischen Befunde

Der oxydo-reduktive Zustand des Blutes in den einzelnen Kaninchengruppen wurde mit Hilfe der von Pischinger [14, 15] angegebenen jodometrischen Methode untersucht. Die Jodometrie beruht auf der Umwandlung von elementarem (J_2) in ionales (2 J') Jod und umgekehrt. Sie erlaubt, durch Bestimmung der verbrauchten Jodmenge einerseits ungesättigte, aliphatische Gruppen, andererseits reduzierende Reaktanten quantitativ (bezogen auf die eingehaltene Methode, siehe Seite 370) zu erfassen. Die Jodverbrauchszahlen sind also ein relatives Maß für das gesamte Reduktionsvermögen des Serumextraktes. Natürlich können aus dieser Arbeit keine statistischen Mittelwerte gezogen werden, da ja nur eine kleine Anzahl von Tieren beobachtet werden konnte, aber trotzdem scheinen die Ergebnisse in den einzelnen Gruppen verwertbar. In Gruppe I betrug der Mittelwert 30,8 mg%, in der Gruppe III nach siebentägiger Hibernation 64,9 mg% verbrauchten Jods. Bei den einzelnen Versuchstieren verhalten sich die Ausgangswerte nicht gleich und hängen offenbar von der Konstitution und dem Zustand der Tiere ab.

Diskussion

In den vergangenen Jahren hat man versucht, mit verschiedenen histochemischen Methoden die Aktivität der Nebennierenrinde zu beurteilen [16, 20]. Es hat sich als schwierig erwiesen, die zellsekretorische Aktivität der Nebennierenrinde nur auf Grund solcher Kriterien, wie Intensität und Charakter der Lipoide oder des allgemeinen Cholesterin und Vitamin-C-Gehaltes, direkt zu messen und zu beurteilen. Deswegen glaubte man, daß die Anwendung des 2-3-5-Triphenyltetrazoliumchlorid für die direkte Aktivitätsbewertung der Nebennierenrinde für dieses Problem besser geeignet sei [23]. Dieses Reagens wurde ausgewählt wegen einer Anzahl interessanter Eigenschaften, wie seine Farblosigkeit, Wasserlöslichkeit und Transformierung in ein rötliches unlösliches Formazan. Die intrazellulären Ablagerungen des Formazans können in Gewebsschnitten deutlich beobachtet und gesehen werden, nachdem das Gewebe in einer TTC-Lösung bebrütet

wurde. Die letzten Arbeiten der Literatur [1, 3, 12 und 16] zeigen den Wert des TTC bei Anwendung in lebenden Organismen. Es kann zur Erfassung der metabolischen Aktivität verschiedener Zellen dienen. Es ist noch nicht bekannt, ob die Reduktion ein Hinweis auf die Aktivität eines spezifischen Dehydrasensystems ist, oder nur ein allgemeines Maß für verschiedene Reduktasen. Eine immer größer werdende Anzahl von Beweisen in verschiedenen Geweben zeigt, daß das Ausmaß des reduzierenden TTC annähernd proportional zur totalen metabolischen Aktivität ist [23]. Andere Autoren haben die Nebenniere mit dem 2-3-5-Triphenyltetrazoliumchlorid untersucht und unabhängig von einem exogenen Wasserstoffdonator eine positive Reaktion in den Rindenzellen bekommen, aus welcher sie Rückschlüsse auf die Aktivität der Nebennierenrinde ziehen [24]. Es wurde durch frühere Forschungen festgestellt, daß die Reduktion des farblosen TTC zum unlöslichen Formazan in Gewebeschnitten an die enzymatische Reaktion der lebenden Zellen gebunden ist. Die Reduktion wird durch verletzte oder tote Zellen nicht durchgeführt. Es wurde auch gefunden, daß die Reaktion von der Temperatur abhängig ist, spezifische Inhibitoren, welche die metabolische Aktivität der Zellen herabsetzen, setzen auch die Fähigkeit der Zelle TTC zu reduzieren herab oder verhindern sie ganz. Die Anwendung des TTC zum Studium lebender Zellen wurde zuerst an Setzlingen bearbeitet [11] und dann erst später zur Untersuchung in unizellulären Organismen angewandt. Später wurden Schnitte lebender Gewebe inkubiert und untersucht [13 und 21]. Erst Black und Kleiner [3], machten Gebrauch von der Gewebeschnitttechnik. Auch andere Forscher fanden reduziertes TTC im Gewebe und meinen, daß die Ergebnisse mit dieser Methode als Maßstab für die Aktivität verschiedener Zellen gewertet werden könnte [4, 23 und 24]. Die Kapazität des TTC, unter den aeroben Verhältnissen sich zu reduzieren, ist ungefähr proportional der allgemeinen Aktivität der Zelle, welche durch Messungen des Sauerstoffverbrauches bestimmt wurde. Es muß aber betont werden, daß die TTC-Reaktion ein Maßstab ist für einen oder mehrere Wasserstoffdonatoren und daher nicht direkt mit dem Sauerstoffverbrauch verglichen werden kann. Es soll auch beachtet werden, daß Zellen wahrscheinlich auch metabolische Prozesse durchführen, welche weder Reduktase- noch Dehydrogenase-Aktivitäten dieses Typs benötigen, welcher durch TTC gemessen werden kann. Das Ausmaß, bis zu welchen die Reduktion des TTC in der Nebennierenrinde, ein Maß der sekretorischen Aktivität dieser Zellen geben kann, ist von primärem Interesse. Die Zellen der Nebennierenrinde enthalten zahlreiche Lipoidtröpfchen verschiedener Größe, die mit Hilfe histochemischer Methoden darstellbar sind. Es wurde in dieser Arbeit kein enger Parallelismus zwischen den Fettkörperchen und Formazanablagerung gefunden, so wie es ein anderer Autor beschreibt [24]. Es kommt schon bei kurzer Hibernation zu einem Lipoidverlust in der Nebennierenrinde, aber nie wurde eine lipoidfreie Zona fasciculata gefunden, wie es bei negativem Ausfall der TTC-Reaktion der Fall ist. Außerdem kommt es bei der Hibernation auch zu einem kleinen Verlust der Lipoide in der Arcuata, wo gerade die Formazanablagerungen am stärksten sind. Zwar scheint das Formazan in den Fettröpfen gelöst zu sein, aber höchst-

wahrscheinlich sind auch andere Faktoren entscheidend oder sind es nur bestimmte Lipoide, die die Fähigkeit haben, TTC aufzunehmen. Es könnte sich um ungesättigte Lipoide handeln, die die Reduktionsfähigkeit in den Schichten der Nebenniere erhöhen. Die Untersuchung von Serumproben mit der oben skizzierten jodometrischen Methode (S. 370) ergibt eine Zunahme des Jodverbrauches von 30,8 mg% vor Beginn des Versuches auf 64,9 mg% nach siebentägiger Hypothermie. Da die Jodometrie auf der Reduktion von elementarem (J_2) in ionales (2 J') Jod (bzw. umgekehrt) beruht, kommt es also während der pharmakologischen Hypothermie zu einer erhöhten Reduktionslage im Blut, die möglicherweise auch zur Dehydraseaktivität der Nebennieren in Beziehung steht. Es scheint daher einen gewissen Parallelismus zwischen der Succinodehydrase und dem oxydo-reduktiven Zustand des Blutserums, der zum größten Teil von ungesättigten Fettsäuren bestimmt wird, zu geben. Diese Beobachtungen bedürfen noch weiterer Untersuchungen an einem größeren Material. Wie es aus den Arbeiten Pischingers und seinen Mitarbeitern hervorgeht, besteht eine enge Beziehung zwischen Jodverbrauch und oxydo-reduktive Potential. Grundsätzlich bedeutet ein niederer Jodverbrauch ein relativ hohes positives Potential und umgekehrt. Die genannten Autoren sehen sich in vielen Beobachtungen veranlaßt, in diesen Systemen eine stoffliche Grundlage für die primitive humorale Regulation zu sehen. Somit zeichnet sich bei der pharmakologischen Hypothermie eine allgemeine bzw. Gesamtumschaltung in der vegetativen Reaktionslage der Tiere ab, die schließlich nicht überraschen kann.

Die relative Unabhängigkeit der Zona arcuata und fasciculata von der funktionellen Aktivität der Nebenniere wurde deutlich beobachtet. Nicht eindeutig sind die Ergebnisse in der Reticularis. Eine Zwischenzone, so wie sie bei Ratten beobachtet wurde, kann bei der TTC-Technik in den Nebennieren von Kaninchen nicht gefunden werden [17, 24]. Es wurde in der Literatur angegeben, daß das reduzierte TTC im allgemeinen in Form feiner Granula oder Kristalle innerhalb der Zelle abgelagert wird. Man sieht jedoch auch diffuse TTC-Ablagerungen im zytoplasmatischen Lipoid. Die Lipoide- oder Lipoproteinkomplexe besitzen sichtlich die Eigenschaft, TTC aktiv zu reduzieren. Es scheint mir aber wegen der nicht kristallinen Verteilung der Reaktionsprodukte fraglich, ob man eine solche diffuse Ablagerung (ohne Granula und Kristallbindung) als positiven Befund ansehen kann.

In den letzten Jahren wird schärfer betont, daß die anatomische Zonierung der Nebennierenrinde einer funktionellen Gliederung entspricht [22]. Es wurde schon in früheren Arbeiten über die künstliche Hibernation beobachtet, daß sich vor allem in der Zona fasciculata die histochemischen Reaktionen abspielen [6, 7, 8, 9]. Es läßt sich unschwer verstehen, daß mit deren Abwandlung eine gesamte wie lokale vegetative Umstimmung verbunden ist, die vor allem bei der pharmakologischen Hypothermie sehr bedeutend ist. Die Arcuata scheint bei den Kaninchennebennieren weniger während der Hibernation zu reagieren und hat eine größere Autonomie als die Zona fasciculata. Auch beim Dehydrasenachweis konnten ähnliche Beob-

achtungen gemacht werden. Die Ergebnisse an den Nebennieren dürften die Hypothese der funktionellen Zweiteilung der Nebennierenrinde unterstützen. Die Zweiteilung ist aber nur dann zu verstehen, wenn man das für die Sexualfunktion in Betracht kommende Feld der Reticularis außer Betracht läßt.

Es fragt sich noch, wodurch die Regulation der Bernsteinsäureaktivität erfolgt. Man kann dabei an das vegetative Nervensystem denken, ähnlich wie schon 1926 von Baginski [2] die Vagusinnervation der Nebennierenrinde bzw. eine Nervenwirkung auf die Lipoide in der Nebenniere betont hat.

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wird über das Verhalten der Succinodehydrase in normalen Nebennieren und während der pharmakologischen Hypothermie berichtet. In den Nebennieren der Kontrollgruppe läßt sich histochemisch eine positive TTC-Reaktion in der Zona arcuata, im äußeren Teil der Fasciculata und in der Reticularis nachweisen. Nach sechsstündiger Hibernation kommt es zu einer wesentlichen Enzymzunahme in der Zona arcuata, jedoch zu einer Abnahme in der Zona fasciculata und Zona reticularis. In Gruppe III (siebentägiger Hibernation) wurde eine sehr intensive Enzymaktivität in der Zona arcuata und Zona reticularis nachgewiesen. Diese Ergebnisse an den Nebennieren dürften die Hypothese der funktionellen Zweiteilung unterstützen, wobei das für die Sexualfunktion in Betracht kommende Feld der Zona reticularis nicht mitgerechnet ist.

Es wurde kein Parallelismus zwischen der Bernsteinsäureaktivität und den histochemisch nachweisbaren Lipoiden gefunden. Es wurde mit der von Pischinger [14, 15] angegebenen Methode der oxydo-reduktive Zustand des Blutes untersucht. Während der pharmakologischen Hypothermie kommt es zu einer erhöhten Reduktionslage des Blutes. Die TTC-Reaktion kann mit Berücksichtigung anderer histochemischer Untersuchungen ein wichtiger Maßstab für die Beurteilung der Nebennierenaktivität sein.

Literatur

[1] Antopol, W., S. Glaubach, and L. Goldman, 1950: Trans. N. Y. Acad. Sci., Series II *12*, 156.
[2] Baginski, S., 1926: Bull. Histol. Appl. *3*, 185.
[3] Black, M. M., and I. S. Kleiner, 1949: Science *110*, 660.
[4] — S. R. Opler, and F. D. Speer, 1950: Am. J. Path. *26*, 1097.
[5] Greep, R. O., and H. W. Deane, 1949: Ann. N. Y. Acad. Sc. *50*, 309.
[6] Jonek, J., 1939: Folia Morphologica *3*, 231.
[7] — 1939: Endokrynologia Polska *10*, 377.
[8] — 1939: Endokrynologia Polska *10*, 365.
[9] — 1938: Przeglad Lekarski, Seria II, *14*, 337.
[10] — Über das Verhalten der Phosphatasen und Lipasen in den Nebennieren von Kaninchen während der pharmakologischen Hypothermie. (Im Druck.)
[11] Kuhn, R., 1941: Ber. deutsch. Chem. Ges. *74 b*, 949.
[12] Kun, E., and L. G. Abood, 1949: Science *109*, 144.
[13] Mattson, M. A., C. D. Jensen, and R. H. Dutcher, 1947: Science *106*, 294.

[14] Pischinger, A.: Über die vegetativen, insbesondere humoralen Grundlagen des Herdgeschehens. Ber. d. Deutsch. Arb. f. Herdforsch. Nauheim 1960. Ärztl. Praxis.
[15] — Der Krebsarzt, Verlag Urban & Schwarzenberg, Jahrg. 6, Heft 5, 619.
[16] Ruttenburg, A. M., B. S. Gofstein, and A. M. Seligman, 1950: Cancer Research *10*, 1130.
[17] Sarason, E. L.: Arch. Path. 35, 373.
[18] Seligman, A. M., and A. M. Ruttenburg, 1951: Science *113*, 317.
[19] Semeneff, W. E., 1935: Z. Zellforsch. mikrosk. Anat. *22*, 305.
[20] Selye, H., and H. Stone, 1950: On the Experimental Morphology of the Adrenal Cortex. C. C. Thomas, Springfield, Ill.
[21] Straus, F. G., N. D. Cheronis, and E. Straus, 1948: Science *108*, 113.
[22] Tonutti, E., 1941 a: Z. mikrosk.-anat. Forsch. *50*, 495.
[23] Zweifach, B. W., M. M. Black, and E. Shorr, 1950: Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. *14*, 848.
[24] — — — 1951: Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. *76*, 446.

Anschrift des Verfassers: Doz. Dr. med. Józef-Jan Jonek, Sl. Akad. Med. Zakład Histologii i Embriologii, Zabrze 8-Rokitnica, ul. Karola Marksa 19, (Polen).

Die Formbildung von *Micrasterias rotata* Ralfs und ihre experimentelle Beeinflussung

Von

O. Kiermayer und **R. Jarosch**

Aus der Biologischen Forschungsabteilung der Österreichische Stickstoffwerke AG. und der Mikrobiologischen Station der Stadt Linz

Mit 67 Textabbildungen

(Eingegangen am 27. Mai 1961)

Inhalt

I. Einleitung 383
II. Versuchsmaterial und Präparationsmethode 383
III. Das Geschehen bei der normalen Formbildung 385
1. Die Formdifferenzierung der Bildungsmembran 385
2. Die Bildung der Dauermembran 387
3. Das Gallertnetz 388
4. Das Protoplasma und seine Inhaltskörper 390
a) Der Kern 390
b) Der Chloroplast 390
c) Lipoidtropfen 391
d) Golgi-Körper und Vakuolen 391
e) Die Chondriosomen 394
f) Die Sphärosomen und das Verhalten der Plasmabewegung 394
IV. Die Abhängigkeit der Formbildung vom Turgordruck 397
1. Allgemeine Voraussetzungen und die Bedeutung des osmotischen Wertes 397
2. Die Bildungsmembran in der turgorlosen Zelle 398
a) Die Anlagerungsmuster der Bildungsmembran 398
b) Eigenschaften der Bildungsmembran 402
3. Veränderungen der Formbildung bei turgorverminderten Zellen . . . 403
4. Veränderungen der Formbildung nach zeitweiliger Ausschaltung des Turgordruckes 404
V. Der Einfluß von Wirkstoffen auf die Formbildung 408
VI. Der Einfluß anderer Außenfaktoren auf die Formbildung 410
VII. Spontane Formbildungsänderungen 411
VIII. Diskussion 413
Zusammenfassung 416
Literatur 417

I. Einleitung

Micrasterias rotata Ralfs ist eine der schönsten Desmidiaceen. Ihre große, fein differenzierte Gestalt gestattet in hervorragender Weise das Studium des Membranwachstums während der Formbildung. Bis heute ist die Formbildung der Einzeller noch kaum zum Problem der Protoplasmaforschung geworden. Wohl haben die langjährigen Arbeiten von W a r i s (1933 f.) und K a l l i o (1949 f.) die Bedeutung des Kernes für die Form der *Micrasterias*-Zelle weitgehend erhellt — ihre Ergebnisse und Folgerungen werden uns am Ende dieser Arbeit beschäftigen — wie die Form aber durch das Protoplasma hervorgebracht wird, ist noch gänzlich unerforscht. Die folgende Arbeit versucht einen Vorstoß in diese Richtung.

II. Versuchsmaterial und Präparationsmethode

Das verwendete Algenmaterial stammt aus einem Hochmoor aus der Umgebung von Liebenau (etwa 1000 m Seehöhe) im Oberen Mühlviertel (Oberösterreich). Ein leicht von Wasser (pH etwa 3,0) durchflossener Graben[1] führte im Sommer massenhaft *Micrasterias rotata*, dazwischen vereinzelt *Micrasterias Thomasiana, Netrium digitus, Spirotaenia condensata, Pleurenterium tumidum* (vgl. K i e r m a y e r und J a r o s c h 1961) u. a. Da bei *Micrasterias rotata* ein hoher Prozentsatz mißgebildeter Formen auffallend war, fuhren die Autoren noch im November 1960 in das schon schneebedeckte Moor, um größere Wassermengen und Schlammproben zur Untersuchung der Radioaktivität einzuholen. Ein Teil des schlammigen Wassers kam in ein 250 ccm Glasgefäß und wurde in ein helles Fenster gestellt. Hier setzte sich eine etwa 1 cm dicke Schlammschicht ab, in der nun durch Monate eine intensive Teilungstätigkeit der *Micrasterias rotata*-Zellen zu beobachten war. Die von der Witterung abhängige Wassertemperatur schwankte in den Wintermonaten zwischen $+2$ und $+12^0$ C. Die größte Häufigkeit des Teilungsbeginnes lag dann in den Morgen- oder Vormittagsstunden. Am Nachmittag oder Abend war die Formdifferenzierung dieser Zellen bereits beendet. Etwa zwei Monate später, bei wärmerer Witterung, begann das gleiche Material die Teilung bereits nach Mitternacht. Es muß daher angenommen werden, daß die in der Winternacht sehr geringe Wassertemperatur eine Verzögerung des Teilungsablaufes bewirkt hat (vgl. Abschnitt VI), so daß auch noch am Morgen und Vormittag frühe Teilungsstadien zu finden waren. Durch die Überführung in Zimmertemperatur wurde der Teilungsablauf dieser Stadien natürlich wieder beschleunigt[2].

Die Untersuchungsmethode war folgende: Große Tropfen des schlammigen Bodensatzes wurden im Lupenbereich mikroskopiert, Teilungsstadien unter dem Mikroskop herauspipettiert und mit einem kleinen Tropfen auf

---

[1] Für den genauen Hinweis auf den Fundort danken wir herzlich Fr. Dr. E. F e t z m a n n und Herrn Doz. Dr. W. U r l vom Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Wien.

[2] W a r i s (1956) nimmt an, daß der tageszeitlich bestimmte Teilungsablauf von der CO_2-Konzentration im Zellinneren abhängig ist.

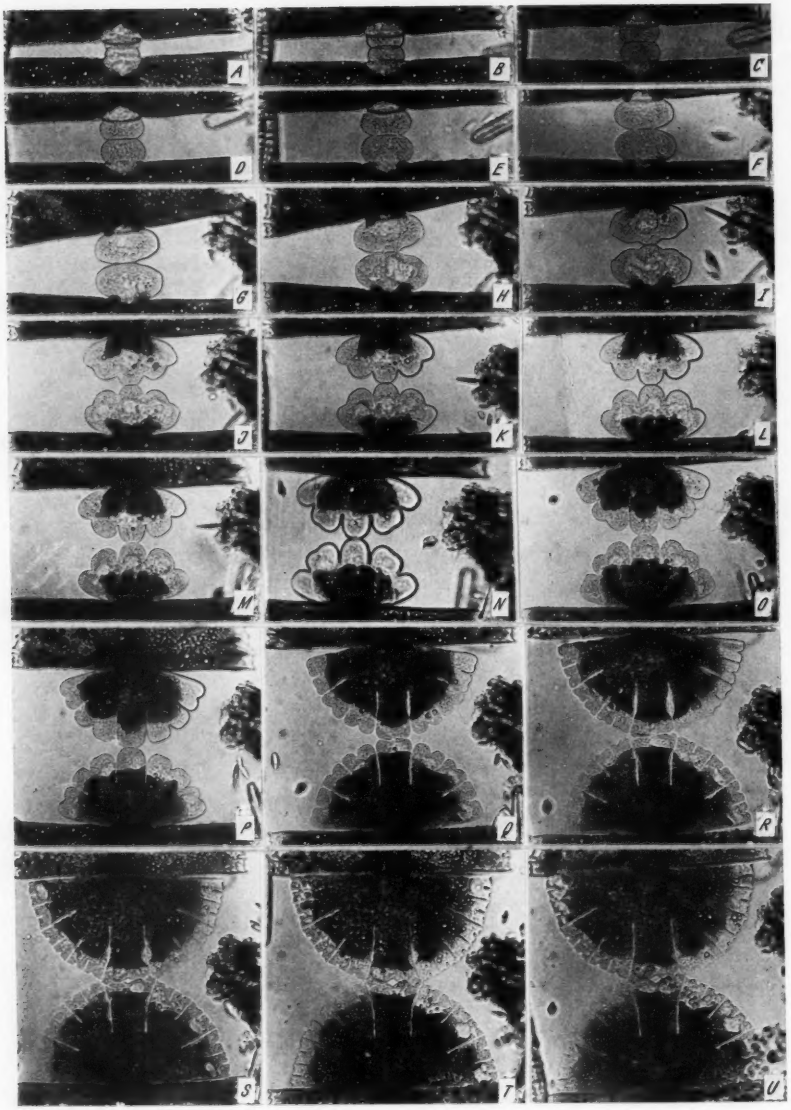


Abb. 1. Die Formdifferenzierung von *Micrasterias rotata* in 21 Stadien. Der zeitliche Abstand von Bild zu Bild beträgt 15 Minuten. (Hellfeld.)

einen Objektträger gebracht. Diese Tropfen wurden nun entweder gleich mit einem Deckglas bedeckt, oder aber das Wasser wurde zuerst unter mikroskopischer Kontrolle mit Filterpapier weitgehend abgesaugt und durch die jeweilige Versuchslösung ersetzt. Die Ränder des Deckglases wurden schließlich mit geschmolzenem Paraffin überstrichen, um die Austrocknung zu verhindern. Die Formdifferenzierung der Zellen in den so luftdicht abgeschlossenen Präparaten geht normal weiter, wenn sonst keine störenden Bedingungen vorliegen. Die neugebildeten Zellhälften erreichen allerdings nicht ganz die Größe der alten.

III. Das Geschehen bei der normalen Formbildung

1. Die Formdifferenzierung der Bildungsmembran

Wenn sich in der dunkelgrün erscheinenden Zelle der chloroplastenfreie Raum um den Kern vergrößert hat und der Kern bereits geteilt ist (nähere

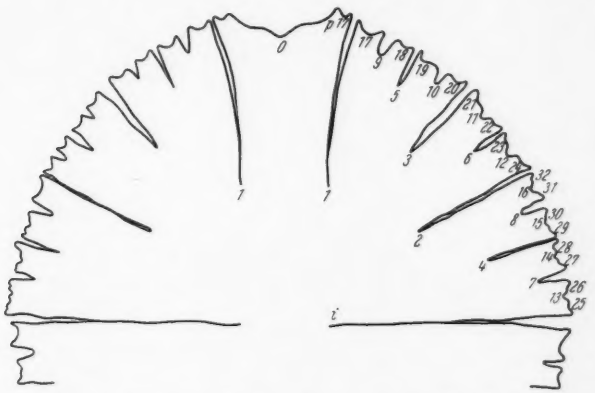


Abb. 2. Nomenklatur der Zelle. Die Einschnitte zwischen den Lappen sind in der Reihenfolge ihrer zeitlichen Entstehung mit Ziffern bezeichnet.

Beschreibung dieser Vorgänge und der Kernteilung bei Waris [1950a] und Kallio [1951]), beginnen die beiden alten Zellhälften auseinanderzuweichen. Abb. 1 zeigt das sich nun weiter abspielende Geschehen im Abstand von je 15 Minuten photographiert. Der Beginn des Auseinanderweichens liegt etwa 30 Minuten vor Stadium A. Das trennende Septum ist in diesem Zustand bereits gebildet.

Es kommt zuerst zur Entstehung zweier Bläschen, deren Hüllmembran aus dem Septum hervorgeht (Lefèvre 1939). An den Bläschen werden dann Einbuchtungen sichtbar (Abb. 1, *G, H, I*), die den Einschnitten zwischen den späteren Hauptlappen entsprechen. Die Lappen zwischen den Einschnitten vergrößern sich (*J, K, L, M*), und nun beginnt eine neuerliche Einschnürung zuerst des inneren (*N*), dann des äußeren Seitenlappens (*O*), während sich der Mittellappen vorläufig nicht weiter differenziert. Die durch

Einschnürungen bedingte Aufteilung der Lappen geht schnell weiter (*P*, *Q*, *R*), so daß in *S* und *T* bereits die endgültige Formdifferenzierung erreicht ist. Auch der Mittellappen hat zu diesem Zeitpunkt seine Ausgestaltung schon erhalten.

Zwischen den Mittellappen der beiden Tochterzellen kommt es gegen Ende der Formdifferenzierung zu einer charakteristischen Lagebeziehung (Abb. 3), die eine Neigung der Ebenen beider Tochterzellen gegeneinander zur Folge hat.

Wenn man die zeitlich nacheinander entstehenden Einschnürungen numeriert[2a], so gelangt man zu einer einfachen, wenn auch willkürlichen Nomenklatur der Lappen (Abb. 2). Um einen Lappen oder den Teil eines

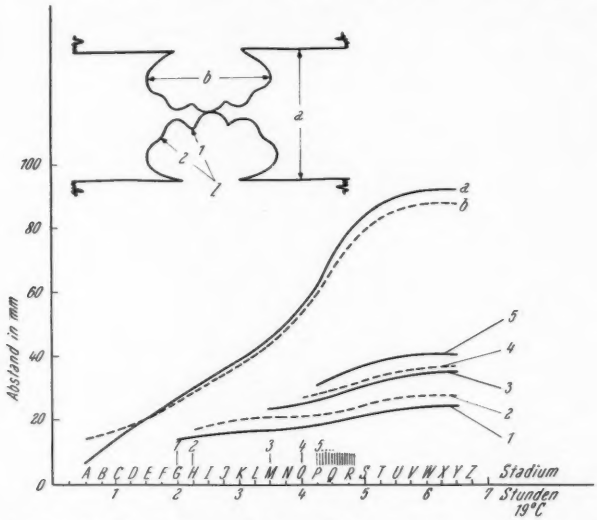


Abb. 3. Graphische Darstellung des Formbildungsprozesses. Abszisse: Zeit bzw. Stadium, Ordinate: Abstand, gemessen an der photographischen Vergrößerung. Zur besseren Übersicht sind verschiedene Abstände oben in der Skizze eingezeichnet. Der Beginn der jeweiligen Einschnürung ist an der Abszisse durch einen senkrechten Strich angedeutet. Näheres im Text.

Lappens zu bezeichnen, kann man einfach die Zahlen der ihn begrenzenden Einschnitte angeben, z. B. der Mittellappen: 1, 1, der innere Seitenlappen: 1, 2, oder ein Teil des äußeren Seitenlappens: 4, 7 usw. Der Isthmus-Einschnitt der alten Zellhälfte sei hier mit *i* bezeichnet. (Warum in Abb. 2 der Einschnitt des Mittellappens mit *O* bezeichnet ist, wird sich erst im Abschnitt IV ergeben.) Da die *Micrasterias*-Zelle eine biradiale Symmetrie hat (vgl. Teiling 1950), genügt die Betrachtung eines Viertels der ganzen Zelle.

[2a] Wie es bereits unabhängig von Drawert und Mix (1961 b) angegeben wurde.

Man sieht in Abb. 2 sofort, daß jeder Einschnitt um so tiefer ist, je früher er entsteht. Bis 6 entstehen die Einschnitte deutlich nacheinander. Ob 7 oder 8 zuerst da ist, 9 oder 10, 11 oder 12, ist kaum mehr feststellbar. Die Glieder dieser Paare entstehen nahezu gleichzeitig. Man kann aber sehr wohl beobachten, daß zuerst 7 und 8, dann 9 und 10, dann 11 und 12 usw. gebildet werden (vgl. Abb. 1, *R*).

In Abb. 3 unten ist durch die senkrechten Striche die zeitliche Verteilung des Einschnürungsbeginnes eingezeichnet, wobei sich die Zahlen auf die Einschnürungen entsprechend der Abb. 2 beziehen. Die mit 1, 2, 3, 4 und 5 bezeichneten Kurven zeigen die Veränderung des Abstandes des innersten Punktes der jeweiligen Einschnürung vom Zellzentrum (Z, vgl. die Skizze in Abb. 3). Die Kurve *a* veranschaulicht die Zunahme des Abstandes der beiden alten Zellhälften, die Kurve *b* die Zunahme der größten Breite der neuen Zellhälfte.

Man sieht aus Abb. 3, daß die Kurven 1, 2, 3, 4 und 5 im Verlauf des Zellwachstums langsam ansteigen, keinesfalls aber absinken. Dies bedeutet, daß die Einschnürungen der Bildungsmembran nicht ins Plasma hineingezogen werden. Sie bleiben vielmehr gegenüber den zwischen ihnen weiterwachsenden Lappen zurück. Das geringe Ansteigen der Kurven ist Ausdruck des Membranwachstums der ganzen neuen Zellhälfte, also auch jener Membranflächen, deren Kontur in der normalen Zellage nicht sichtbar ist.

An allen Kurven der Abb. 3, besonders an *a* und *b*, fällt auf, daß sie etwa ab Stadium *N* stärker ansteigen als vorher, so als wäre die Wachstumsgeschwindigkeit der Lappen erhöht. Dies beruht nun anscheinend darauf, daß die peripheren Teile der neugebildeten Zellhälfte bedeutend dünner sind als die zuerst gebildeten zentralen, wie eine Aufnahme des Stadiums *K*, gesehen von der Schmalseite der Zelle, erkennen läßt (Abb. 7). Die Volumszunahme der scheibenförmigen Zelle erfolgt hier stärker in der Scheibenebene, gleichsam auf Kosten der Scheibendicke. Auch an der zeitlichen Verteilung des Einschnürungsbeginnes läßt sich eine bedeutende Erhöhung der Differenzierungsgeschwindigkeit ab Stadium *P* feststellen (vgl. die senkrechten Striche in Abb. 3).

2. Die Bildung der Dauermembran

In Abb. 4*a* (Stadium *S*) ist die Formdifferenzierung im wesentlichen beendet, das Wachstum geht aber noch weiter. Die Lappen werden größer und gröber. Sie verlieren ihre „weichen" Konturen und die Einschnitte zwischen ihnen spreizen sich etwas (Abb. 4*b*, 2 Stunden nach Stadium *S*). Wenn die endgültige Form und Größe erreicht ist, so bemerkt man, daß die Membran allmählich dicker und stärker lichtbrechend wird (Abb. 4c, 4 Stunden nach Stadium *S*). Wurde die Formdifferenzierung durch eine äußere Einwirkung gehemmt (vgl. Abschnitt IV), so setzt diese Veränderung der Membran ebenfalls ein. Anscheinend erfolgt sie eine gewisse Zeitspanne (bei Zimmertemperatur etwa 8 Stunden) nach dem Beginn des Auseinanderweichens der beiden alten Hälften. Ist bei Zellen, deren Turgordruck künstlich entfernt wurde

(vgl. Abschnitt IV), dieser Zeitpunkt gekommen, so erkennt man deutlich, daß innerhalb der Bildungsmembran eine neue Zellmembran — die Dauermembran — entsteht (Abb. 8, Abb. 32, Abb. 44).

Im Verlaufe der normalen Zellteilung wird nach Bildung der Dauermembran die sehr feine Bildungsmembran abgestoßen und verschleimt (Abb. 6, Abb. 9, Abb. 63).

Dieser Vorgang wurde bei *Pleurotaenium* schon von Focke (1847), Hauptfleisch (1888), Lütkemüller (1902), Schulz (1930) u. a. beobachtet und meist als „Häutung" (vgl. Krieger 1937) bezeichnet. Wirklich klar geworden ist er wohl erst Lefèvre (1939), der die Bildungsmembran als „couche génératrice" von der Dauermembran unterschieden und ihre Degeneration nach vollendeter Teilung beschrieben hat.

3. Das Gallertnetz

Bereits kurz vor oder nach dem Beginn des Auseinanderweichens der beiden alten Zellhälften kann man häufig im Hellfeld oder Phasenkontrast Abscheidungen wahrnehmen (Abb. 10), die dort austreten, wo die Dauermembran an die Bildungsmembran angrenzt. Diese Abscheidungen zeigen eine sehr feine netzartige Struktur (Abb. 11).

Färbt man sich teilende Zellen mit Neutralrot (z. B. 1 : 6000) vital, so erscheint regelmäßig ein die beiden neuen Hälften umhüllendes „Gallertnetz" (Abb. 12), das im ungefärbten Zustand, auch bei der Anwendung von Phasenkontrast, völlig unsichtbar ist. Dieses Netz läßt öfters zwei Lagen erkennen und wird durch die Präparation leicht

---

Abb. 4*a*. Seitenlappen im Bereich von Einschnitt 5 bis Einschnitt 8 im Stadium *S* (Phako. Öl-Im.).

Abb. 4*b*. Der Bereich der Abb. 4*a* zwei Stunden nach Stadium *S* (Phako. Öl-Im.).

Abb. 4*c*. Der Bereich der Abb. 4*a* vier Stunden nach Stadium *S*. Die Dauermembran ist bereits gebildet (Phako. Öl-Im.).

Abb. 5. Die Lage der Mittellappen der neugebildeten Zellhälften nach beendeter Formbildung (Hellfeld, Öl-Im.).

Abb. 6. Die beiden Zellen sind auseinandergewichen. Die teilweise verdickte Bildungsmembran der Mittellappen wird abgestoßen. Das die Zellen umhüllende Gallertnetz ist oben stärker gefärbt, weil der Farbstoff aus dieser Richtung angesaugt wurde. Neutralrot-Färbung, 1 : 6000, gelöst in Aqua dest. (Hellfeld, Öl-Im.).

Abb. 7. Stadium *K* in Seitenansicht (Hellfeld).

Abb. 8. Die Zellen lagen vom Stadium *K* an etwa 24 Stunden in 0,2 mol TRZ und wurden dann zerquetscht. Die stärker leuchtende Dauermembran liegt der verdickten Bildungsmembran innen an (Anoptral-Phako).

Abb. 9: Die Bildungsmembran der Seitenlappen wird abgestoßen. Darüber liegt das Gallernetz. Neutralrot-Färbung 1 : 6000 (Hellfeld, Öl-Im.).

Abb. 10. Abscheidungen, die an der Grenze zwischen Bildungsmembran und Dauermembran austreten (Hellfeld, Öl-Im.).

Abb. 11. Wabenförmige Struktur dieser Abscheidungen (Phako. Öl-Im.).

Abb. 12. Das Gallertnetz umhüllt die beiden neuen Zellhälften, Neutralrot-Färbung, 0,2 mol TRZ (Hellfeld, Öl-Im.).

Abb. 13. Das Gallertnetz wurde bei der Präparation teilweise zerrissen, Neutralrot-Färbung, (Hellfeld).

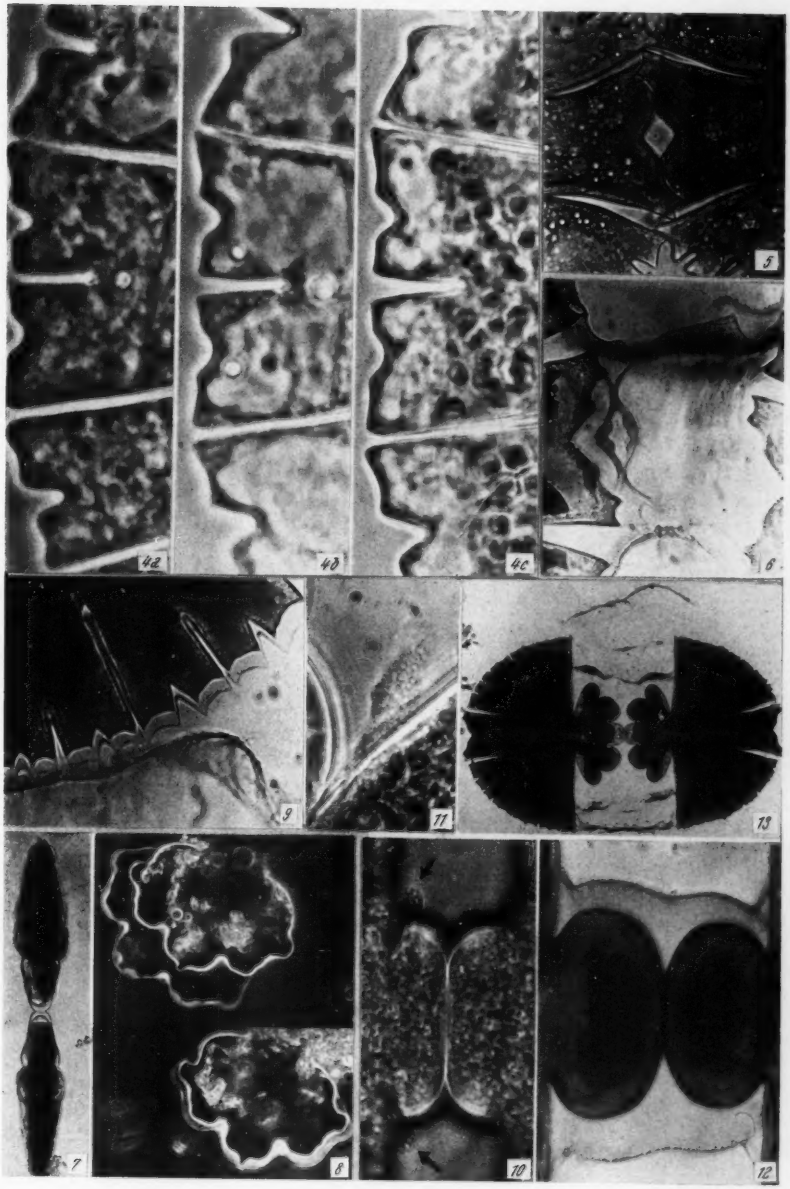


Abb. 4 *a* bis Abb. 13

zerrissen oder deformiert (Abb. 13). In Abb. 6 und Abb. 9 ist es deutlich von der bereits abgestoßenen Bildungsmembran zu unterscheiden. In Abb. 6 oben ist auch die feine, netzartige Struktur der Gallerthülle zu erkennen.

Das Verhalten der Gallerthüllen von Desmidiaceen bei der Vitalfärbung wurde bereits ausführlich untersucht (vgl. Höfler und Schindler 1932, Kinzel 1933), und es besteht kein Zweifel, daß es sich bei dem beschriebenen Netz um eine ähnliche Gallertabscheidung handelt. Augenscheinlich kommt ihr eine spezielle Schutzfunktion für die neuen Zellhälften zu.

Auch auf den alten Zellhälften färben sich gelegentlich ähnliche Gallertfäden (vgl. Drawert und Mix 1961 a), die anscheinend durch die über die ganze Dauermembran verteilten Poren abgeschieden werden. Das „Gallertnetz" dürfte das Abscheidungsprodukt von Poren sein, die im Isthmus-Einschnitt gelegen sind. Wann die Poren entstehen, ließ sich nicht feststellen, vermutlich aber erst im Zusammenhang mit der Dauermembran.

Es lag nahe, an eine Beziehung zwischen der zuerst beschriebenen Abscheidung (vgl. Abb. 10 und Abb. 11) und dem „Gallertnetz" zu denken, doch konnten dafür keine Anhaltspunkte gefunden werden. Mit Neutralrot gefärbt erscheint vielmehr das „Gallertnetz" stets unabhängig, ohne daß eine Beziehung zwischen den beiden Ausscheidungen zu beobachten ist. Es kann vermutet werden, daß es sich bei der zuerst beschriebenen um ein Restprodukt des Membranlösungsvorganges handelt, der die Voraussetzung ist für das Auseinanderweichen der beiden alten Zellhälften.

4. Das Protoplasma und seine Inhaltskörper

a) Kern

Über die Veränderungen, die am Kern vor und während der Teilung zu beobachten sind vgl. Kopetzky-Rechtperg (1932), Waris (1950 a) und Kallio (1951).

Was die Lage der Tochterkerne betrifft, so befinden sie sich anfangs (Stadium *A*, Abb. 1) noch innerhalb der alten Zellhälften. Sie bewegen sich aber schon ganz langsam in Richtung der neuzubildenden Hälften (*B*, *C*, *D*, *E*). In Stadium *F* und *G* nehmen sie dort bereits ihre zentrale Lage ein, und zugleich beginnen die ersten Einschnürungen der Bildungsmembran. Im Verlauf der Formbildung behalten nun die Kerne ihre zentrale Lage in den neugebildeten Hälften bei, rücken aber in dem Grad, wie die neuen Hälften den alten ähnlicher werden, allmählich wieder in die Zentren der ganzen Zellen.

Wie Kallio (1951) gezeigt hat, ist die Bildung des die beiden Tochterzellen trennenden Septums wesentlich vom Abstand Kern—Septum abhängig. Dagegen erfolgt nach Kallio die Formdifferenzierung auch dann normal, wenn der Kern aus seiner zentralen Lage herauszentrifugiert worden ist.

b) Der Chloroplast

Die Chloroplasten der sich teilenden Zellen erscheinen dunkelgrün und mit Stärkekörnern angefüllt. Mit Jod-Jod-Kali behandelt färben sich die Stärkekörner und Pyrenoide intensiv dunkelbraun. Dabei ist auffallend,

daß sowohl in ruhenden als auch in sich teilenden Zellen die peripheren Teile des Chloroplasten keine Stärkekörner enthalten.

Während der Formbildung sieht man häufig, daß sich vom Chloroplasten kleine runde Teilchen loslösen und ins Plasma der neuen Zellhälfte gelangen, wo sie sofort von einer Vakuole umgeben erscheinen. Anscheinend lösen sich diese Teilchen dann allmählich in den Vakuolen auf. Solche Teilchen kann man meist auch in ruhenden Zellen beobachten, wo sie in die großen Vakuolen hineinragen (Abb. 21). Diese Teilchen haben etwa die Größe der Stärkekörner, zeigen aber keine Stärkereaktion!

Das langsame Hineinwandern der Chloroplasten in die neugebildeten Zellhälften ist deutlich in Abb. 1 zu verfolgen.

Die Durchschnürung der Chloroplasten in den ausgebildeten Tochterzellen bzw. die Bildung des chloroplastenfreien Raumes um den Kern, erfolgt erst etwa 1 bis 2 Tage nach Beendigung der Formdifferenzierung.

c) Lipoidtropfen

Von den oben beschriebenen kontrastarmen Teilchen sind die bekannten, auffallend stark lichtbrechenden Lipoidtropfen zu unterscheiden, von denen einige meist mit dem Chloroplasten in die neuen Zellhälften eingeschleppt werden (Abb. 1, *J, K, L* obere Zelle, Abb. 31, Abb. 33). Bei Osmiumsäure-Fixierung erscheinen diese Tropfen intensiv schwarz gefärbt.

d) Golgi-Körper und Vakuolen

Beobachtet man das Plasma der neugebildeten Zellhälften mit starker Vergrößerung, so erkennt man schon in den frühesten Stadien eine große Zahl kleiner, spindelförmiger Körper, die besonders dicht in der Nähe des Kernes konzentriert sind (Abb. 14). Wie auch im Characeen-Plasma beobachtet wurde (Jarosch 1961), haben diese Körper die Eigenschaft, bei einer gewissen Lage ihre charakteristische scharfe Kontur zu verlieren und nur als schwach lichtbrechender Fleck zu erscheinen. Ihre Größe variiert in dem Sinne, daß in manchen Zellen durchwegs große (Länge etwa 2,0 μ), in anderen durchwegs kleinere anzutreffen sind. Mit sehr großer Wahrscheinlichkeit handelt es sich hier um die elektronenmikroskopisch bekannten Golgi-Körper oder Diktyosomen.

Ist die Formdifferenzierung schon fortgeschritten, so finden sich die Golgikörper in den Zentren der Lappen angereichert. Nur an diesen Stellen entstehen dann später die Vakuolen.

Die Vakuolenbildung geschieht erstens im Rahmen der normalen Entwicklung am Ende der Formdifferenzierung oder kann zweitens, durch Außenumstände provoziert, frühzeitig einsetzen. In beiden Fällen sieht man, daß die Vakuolen neben den Golgi-Körpern aus sehr kleinen Vakuolen durch Vergrößerung oder Verschmelzung entstehen. An den entstandenen größeren Vakuolen erscheinen die Diktyosomen dann oft in die Vakuolenwände eingebaut. Ob sich die großen Vakuolen aus den sogenannten „Golgi-Vakuolen" oder anderen Vakuolen entwickeln (vgl. die elektronenmikroskopischen Befunde und die Diskussion bei Sitte 1958 und Perner 1958) läßt sich lichtmikroskopisch nicht entscheiden.

Unter wahrscheinlich schädigenden Bedingungen (1 : 6000 Neutralrot, 0,2 mol TRZ, gelöst in Linzer Leitungswasser, pH 7,2—7,3) wurden zwar auch leicht gefärbte, im UV-Licht gelb fluoreszierende und vakuolisierte Golgikörper beobachtet, deren Körper sichelförmig einer Bläschenoberfläche anzuliegen schien (Abb. 15, vgl. auch das sehr ähnliche Aussehen der Golgikörper höherer Pflanzen in den elektronenmikroskopischen Bildern nach Kaliumpermanganat-Fixierung bei Wrischer 1961); eine Vergrößerung dieser Bläschen zu normalen Vakuolen wurde jedoch nicht beobachtet.

Die normale Vakuolenbildung setzt etwa im Stadium *S* (Abb. 1) nach vollendeter Formdifferenzierung ein (vgl. Abb. 4 *a*, Abb. 4 *b* und Abb. 4 *c*). Ist die Vakuolenbildung vollzogen, so werden die Golgikörper anscheinend von der zugleich mit der Vakuolenbildung intensiv einsetzenden Plasmaströmung wieder in die Nähe des Kernes befördert, wo sie für die nächste Teilung bereitstehen, die nach Waris (1939) unter optimalen Bedingungen alle drei Tage erfolgt. Bei nicht mehr teilungsbereiten Zellen kann man sie von der Strömung unbewegt in Kernnähe am Chloroplasten angeschmiegt erkennen, wo sie von Chardard und Rouiller (1957) und von Drawert und Mix (1961 a) elektronenmikroskopisch sehr schön dargestellt wurden.

Die frühzeitige Vakuolenbildung wird schon durch die Beleuchtung bei längerer mikroskopischer Beobachtung oder durch Neutralrot-Färbung ausgelöst. Sie konnte auch durch Rhodamin B (1 : 6000, 0,2 mol TRZ, gelöst in

---

Abb. 14. Frühes Entwicklungsstadium, Golgikörper in der Nähe des Kernes (Hellfeld, Öl-Im.).

Abb. 15. Vakuolisierte Golgikörper, Neutralrot-Färbung 1 : 6000, 0,2 mol TRZ, gelöst in Leitungswasser (Phako. Öl-Im.).

Abb. 16. Seitenlappen im Stadium *N* (Phako. Öl-Im.).

Abb. 17. Dieselbe Stelle wie in Abb. 16 im Stadium *O*. Dort, wo in Abb. 16 Golgikörper zu sehen sind, liegen jetzt Vakuolen, deren Entstehung durch die Beleuchtung am Mikroskop ausgelöst worden ist (Phako. Öl-Im.).

Abb. 18. Stark gefärbte Zonen an der Innenseite der verdickten Bildungsmembran des Mittellappens, 60 Min. in 0,2 mol TRZ, dann Neutralrot 1 : 6000, 0,2 mol, gelöst in Leitungswasser (Hellfeld, Öl-Im.).

Abb. 19. Vakuolenfärbung in der alten Zellhälfte. Ein Tag in 1 : 6000 Neutralrot, gelöst in Leitungswasser (Hellfeld, Öl-Im.).

Abb. 20. Myelinfiguren in einer nach intensiver Lichtbestrahlung entstandenen Vakuole (Hellfeld, Öl-Im.).

Abb. 21. Körperchen unbekannter Natur, die vom Chloroplasten abgeschieden werden (Phako. Öl-Im.).

Abb. 22. Seitenlappen etwa 70 Min. in 0,2 mol TRZ, dann Färbung mit Neutralrot (1 : 6000, 0,2 mol TRZ, gelöst in Leitungswasser). Die verdickte Bildungsmembran und eine große Vakuole sind deutlich gefärbt (Hellfeld, Öl-Im.).

Abb. 23. Dieselbe Stelle wie in Abb. 22, 30 Min später. Die Bildungsmembran hat sich entfärbt, die Vakuole erscheint in Teilvakuolen zerklüftet (Hellfeld, Öl-Im.).

Abb. 24. Kugelförmige Farbstoffspeicherung in den Vakuolen der alten Zellhälfte, die zwei Tage in Neutralrot (1 : 6000, gelöst in Leitungswasser) lagen (Hellfeld, Öl-Im.).

Abb. 25. Schichtenförmige Innenstruktur einer Farbstoffkugel (Hellfeld, Öl-Im.).

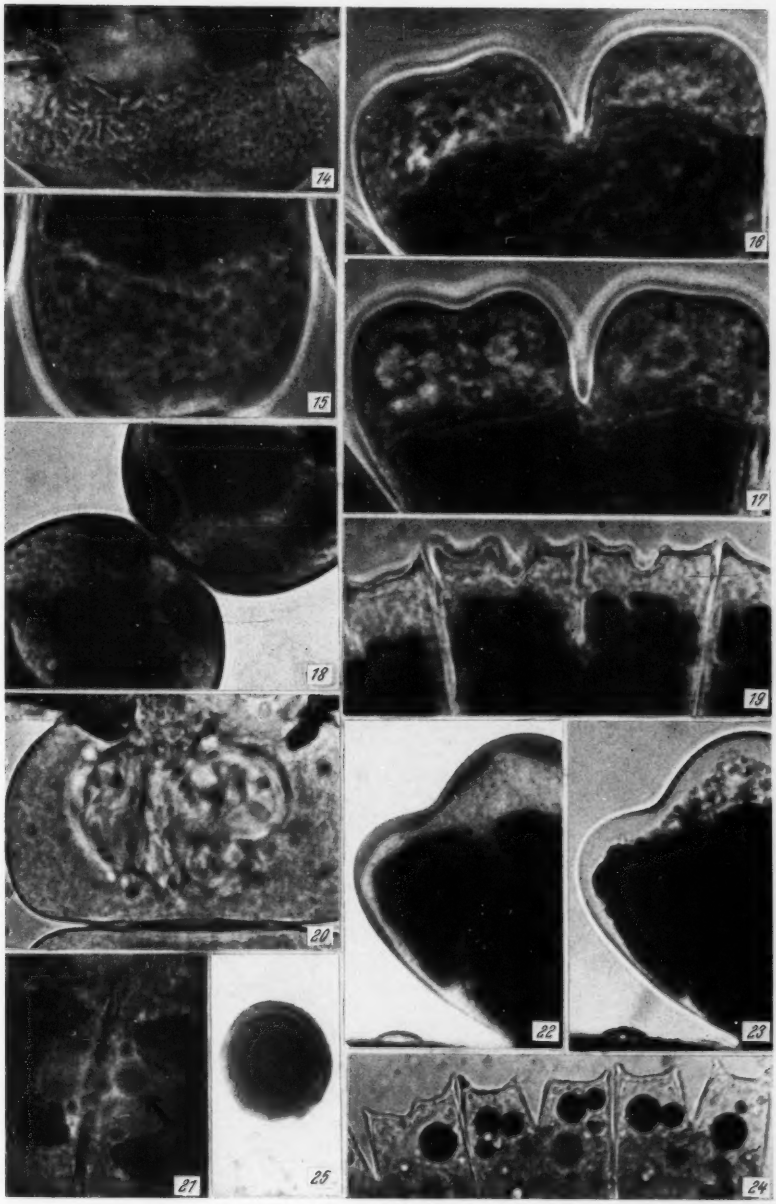


Abb. 14 bis Abb. 25.

Linzer Leitungswasser) induziert werden. Mit diesem Farbstoff zeigten die Golgikörper eine schwach rosa Hellfeldfärbung und fluoreszierten im UV-Licht in einem orangegelben Farbton. Die Vakuolen blieben ungefärbt.

Abb. 16 zeigt Seitenlappen im Stadium *N* mit Golgikörpern und sehr kleinen Vakuolen. In Abb. 17 ist dieselbe Stelle im Stadium *O* abgebildet. Die sehr vergrößerten Vakuolen sind deutlich (Beleuchtung am Mikroskop).

Die provozierte Vakuolenbildung bzw. -verschmelzung ist im gewissen Grad reversibel. Besonders schön läßt sich dies bei den sehr großen Vakuolen beobachten, die bei der Neutralrotfärbung entstehen. Die diffus gefärbt erscheinende Vakuole in Abb. 22 (Neutralrot 1 : 6000, 0,2 mol TRZ, gelöst in Linzer Leitungswasser) hat sich nach 50 Minuten wieder in mehrere Teilvakuolen zerklüftet (Abb. 23). Wahrscheinlich sind auch in Abb. 22 die Wände der Teilvakuolen, wenn auch unsichtbar, vorhanden. Der Vorgang erinnert an die bekannte, in den Drüsenzellen von *Drosera* auftretende „Aggregation" der Vakuole (vgl. Åkermann 1917).

Das Vakuom der alten Zellhälfte zeigte nach Neutralrotfärbung (1 : 6000, gelöst in Linzer Leitungswasser) die u. a. von Cholnoky und Höfler (1950), Hirn (1953) und Kiermayer (1954) ausführlich beschriebene Zerklüftung in Teilvakuolen (Abb. 19) sowie die Bildung von großen, dunkelroten Entmischungskugeln (Abb. 24), deren Innenstruktur, wie Abb. 25 zeigt, schichtenförmig erscheint.

Bei der Neutralrotfärbung von verdickten Bildungsmembranen kam es öfters vor, daß sich an der Innenseite der Bildungsmembran eine intensiv gefärbte Zone bildete (Abb. 18), die sich dann in Form einer Vakuole ablöste.

Nach intensiver Lichtbestrahlung bildeten sich im Plasma meist große Vakuolen, deren Inneres einige Stunden nach der Bestrahlung dicht mit Myelinfiguren angefüllt erschien (Abb. 20).

e) Die Chondriosomen

Im Plasmawandbelag von durchsichtigen Zellen erkennt man kleine, sehr schwer sichtbare Körper, die das typische Aussehen von Chondriosomen haben und nur im Phasenkontrast deutlich sind. Sie werden von der Plasmaströmung kaum bewegt. Infolge der dicken Plasmaschicht in den sich neubildenden Zellhälften bzw. wegen der undurchsichtigen Chloroplasten konnten über sie während der Zellteilung keine Beobachtungen gemacht werden. Nach den elektronenmikroskopischen Befunden von Drawert und Mix (1961 a) stehen die Chondriosomen vielleicht im Zusammenhang mit der Gallertausscheidung durch die Zellwand.

f) Die Sphärosomen und das Verhalten der Plasmabewegung

Die kleinsten lichtmikroskopisch sichtbaren Inhaltskörper des Plasmas erscheinen im Dunkelfeld als hell aufleuchtende punkt- oder kugelförmige Teilchen in der Größenordnung aller Übergänge von ultramikroskopisch bis zu etwa 0,4 μ im Durchmesser. Vergleichbare Teilchen hat Kinzel (1939) im Plasma der Zygnemataceen und Kramer (1960) bei verschiedenen Desmidiaceen beschrieben. Analog zu den sich ähnlich verhaltenden Teilchen im Plasma höherer Pflanzen bzw. zum Characeen-Plasma können

sie auch hier als „Sphärosomen" oder „Prä-Sphärosomen" (vgl. Jarosch 1961) bezeichnet werden. Als Verschiedenheit wäre zu erwähnen, daß die Größenordnung, die im Dunkelfeld ein ringförmiges Aussehen bedingt, hier nicht erreicht wird. Ein Charakteristikum dieser Teilchen ist die Anheftung an die beweglichen Elemente des Plasmas, die die Voraussetzung für die Sichtbarkeit der Bewegungen ist.

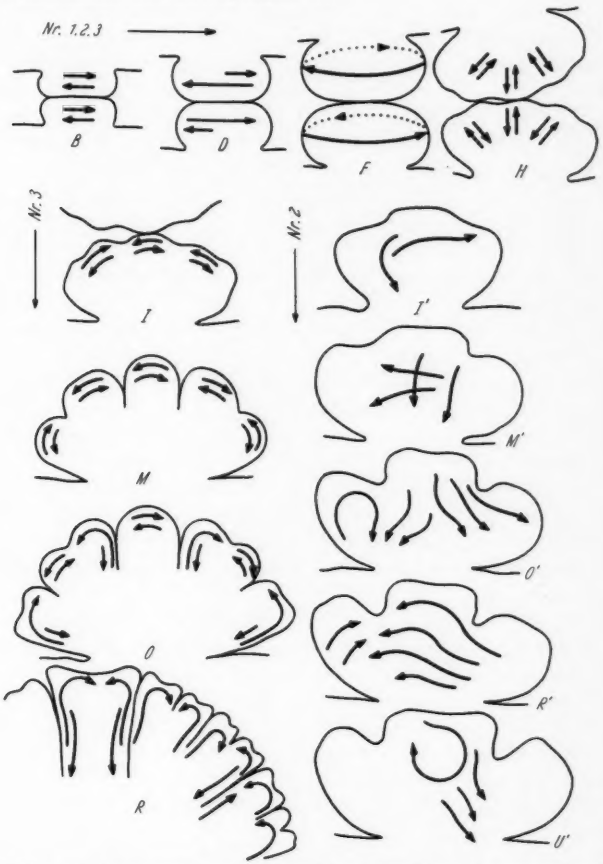


Abb. 26. Schematische Darstellung des Verhaltens der Plasmabewegung während der Formdifferenzierung. Die Pfeile in der horizontalen Bildreihe sollen die Strömung der frühen Stadien, die Pfeile in den senkrechten Bildreihen die Strömung der späten Stadien veranschaulichen. Die senkrechte Bildreihe Nr. 3 zeigt die Strömung bei normaler Formdifferenzierung, die senkrechte Bildreihe Nr. 2 zeigt die Strömung der durch Lichteinwirkung gestörten Formdifferenzierung. Näheres im Text.

Das Verhalten der Plasmabewegung wurde an drei sich teilenden Individuen, vom Beginn des Auseinanderweichens der alten Zellhälften an,

beobachtet. Bei der Beobachtungsreihe Nr. 1 wurde zur Beleuchtung eine gewöhnliche 60-Watt-Lampe mit Blau-Mattscheibe verwendet. Bei der Beobachtungsreihe Nr. 2 diente das hellere Licht einer Niedervoltlampe, ebenfalls mit Blau-Mattscheibe, als Lichtquelle. In beiden Beobachtungsreihen wurde das Licht nicht ausgeschaltet und mit dem Ölimmersions-Objektiv bei optimalem Bildkontrast im Hellfeld beobachtet. In beiden Fällen blieb die Formbildung in frühen Differenzierungsstadien stecken (Abb. 61 zeigt Nr. 1, Abb. 62 Nr. 2). Bei der Beobachtungsreihe Nr. 3 fand ebenfalls die Niedervoltlampe mit Blau-Mattscheibe Verwendung, jedoch wurde das Licht jeweils nur alle 15 Minuten für einige Sekunden angeschaltet. Dieser Zeitraum genügte für Beobachtungen der Plasmabewegung. Bei der Beobachtungsreihe Nr. 3 erreichte die Formdifferenzierung das normale Ausmaß.

In den frühesten Stadien (*A* und *B*) ist eine Bewegung der Teilchen sichtbar, die man etwa als „wogende Agitation“ [3] beschreiben kann. Einzelheiten kann man hier nicht mehr angeben, man gewinnt aber den Eindruck, als würden sich zwei gegenläufige Bewegungsimpulse um die Vorherrschaft im Plasma streiten: die Teilchen wogen hin und zurück. Dieser Bewegungstyp ist in Abb. 26 *B* durch zwei nebeneinanderliegende entgegengesetzt gerichtete Pfeile angedeutet.

Im Stadium *C* und *D* beginnt nun allmählich eine Bewegungstendenz zu überwiegen (Abb. 26 *D*), und es entwickelt sich im Stadium *E* und *F* eine deutliche, ringförmig verlaufende Strömung. Denkt man sich die beiden Tochterkerne durch eine Achse verbunden, so rotiert das Plasma um diese Achse, wobei der Drehungssinn in den beiden Bläschen gegenläufig ist (Abb. 26 *F*). Im Stadium *G* verlangsamt sich nun diese ringförmige Strömung wieder und macht allmählich einer jetzt in verschiedenen Richtungen verlaufenden „wogenden Agitation“ Platz. Zugleich beginnen die ersten Einschnürungen sichtbar zu werden (Abb. 26 *H*).

Etwa bis hierher zeigten alle drei Beobachtungsreihen dasselbe. Von nun an traten Unterschiede auf. Wie in Abb. 26 schematisch dargestellt ist, blieb in der Beobachtungsreihe Nr. 3 die „wogende Agitation“ im weiteren Verlauf der Formdifferenzierung zunächst erhalten (*I*, *M*). Allmählich begannen sich aber aus der Agitation einzelne Bewegungstendenzen herauszubilden, die besonders in den äußeren Lappen deutlich sind (Abb. 26 *O*). Schließlich wurde die Agitation am Ende der Formdifferenzierung zugleich mit der Vakuolenbildung von einer intensiven Strömungstätigkeit in allen Lappenbereichen abgelöst (Abb. 26 *R*).

In den dauernd belichteten Beobachtungsreihen Nr. 1 und Nr. 2 war an Stelle der „wogenden Agitation“ bereits im Stadium *I* eine heftige, unregelmäßige Strömung zu beobachten, die andauernd ihre Lage änderte. In Abb. 26 *I'*, *M'*, *O'*, *R'*, *U'* sind einige auffallende Strömungsrichtungen herausgegriffen, die zu dem Zeitpunkt beobachtet wurden, der dem jeweili-

[3] Der von Seifriz (1943) stammende Ausdruck „Agitation“ beschreibt diese Art der Bewegung besser, als der auf Nägeli (1855) zurückgehende der „Glitschbewegung“, der auch Schwierigkeiten bei der Übersetzung in andere Sprachen bereitet (vgl. Kamiya 1959).

gen Stadium der normalen Entwicklung entsprach. Zwischen diesen Stadien waren viele andere Anordnungen der Strömungsrichtung sichtbar, deren Veränderung zu schnell erfolgte, um aufgezeichnet werden zu können. Wurde das Licht für einige Minuten abgedreht, so konnte man beim erneuten Einschalten wahrnehmen, daß eine Beruhigung eingetreten war. Nach wenigen Sekunden setzte aber wieder eine heftige Strömung ein.

IV. Die Abhängigkeit der Formbildung vom Turgordruck

1. Allgemeine Voraussetzungen und die Bedeutung des osmotischen Wertes

Das Wachstum jeder Pflanzenzelle ist mit Volumsvergrößerung d. h. Wasseraufnahme verbunden. Diese Wasseraufnahme erfolgt nach physikalischen Gesetzen auf Grund der Saugkraft, die der gegenüber dem umgebenden Wasser höher konzentrierte Zellsaft erzeugt (Näheres über diese Verhältnisse vgl. Bancher und Höfler 1939). Bringt man eine wachsende Zelle in eine Zuckerlösung, so wird die Wasseraufnahme und damit die Volumszunahme um so geringer sein, je höher die Konzentration der Zuckerlösung ist (vgl. Thimann et al. 1950).

In Tab. 1 sind die Wirkungen von abgestuften Traubenzuckerkonzentrationen auf sich teilende *Micrasterias*-Zellen überblicksmäßig zusammengefaßt.

Tab. 1. *Die Wirkung verschiedener Traubenzucker-Konzentrationen auf das Wachstum der sich differenzierenden Halbzellen.*

mol TRZ	
0,00 0,05	Weitgehend normale Volumsvergrößerung und Formbildung
0,10 0,15	Volumsvergrößerung vermindert, Bildungsmembran an den nicht entwickelten Lappen verdickt, abnorme Formbildung
0,20	Keine Volumvergrößerung, überall Verdickungen der Bildungsmembran
0,25 0,30	Schwache Plasmolyse, weder Volumsvergrößerungen noch Membranverdickungen Starke Plasmolyse,

Nach Krebs (1951) liegt der osmotische Wert ruhender Zellen von *Micrasterias rotata* relativ konstant bei 0,25—0,30 mol TRZ. Sie findet aber bei sich teilenden Zellen einen geringeren Wert. Auch aus Tab. 1 sieht man, daß der osmotische Wert der sich teilenden Zellen etwa 0,20—0,25 mol TRZ beträgt. Diese Erniedrigung des osmotischen Wertes im Zustand der Teilung ist anscheinend eine wesentliche Notwendigkeit für die Zelle. Werden nämlich frühe Teilungsstadien in tiefere Temperaturen übertragen (Kallio 1951, vgl. auch die dort zitierte Literatur), so bewirkt dies eine Erhöhung des osmotischen Wertes, die häufig ein Platzen der Zellen zur Folge hat. Die zarte Bildungsmembran ist dabei dem höheren Druck nicht gewachsen. In vielen Fällen wird durch den erhöhten Turgordruck das in Bildung begriffene Septum wieder ausgespannt (Kallio 1951) und dadurch zweikernige verwachsene Tochterzellen gebildet (vgl. Abschnitt VII).

Es ist möglich, daß auch die nach Krebs (1951) im Winter stets erhöhten osmotischen Werte mit der Kältewirkung im Zusammenhang stehen. Weshalb die Kälte eine Erhöhung des osmotischen Wertes bewirkt, ist nicht bekannt.

2. Die Bildungsmembran in der turgorlosen Zelle

a) Die Anlagerungsmuster der Bildungsmembran

Bei der Anwendung von 0,20 mol TRZ (vgl. Tab. 1) wurde ausnahmslos keine Volumszunahme der wachsenden Lappen mehr festgestellt. Wohl aber kam es stets zu einer zunehmenden Verdickung der Bildungsmembran. Durch den Verlust des Turgordruckes wird das Flächenwachstum der Bildungsmembran gleichsam in ein Dickenwachstum umgewandelt[3a]. Die Anlagerung der Membransubstanz erfolgt dabei nicht gleichmäßig, sondern gewisse Stellen sind nach einem bestimmten Muster bevorzugt, andere vernachlässigt. Diese Muster erscheinen als schön geschwungene Kurven und sind in ihrem Differenzierungsgrad vom

Tab. 2. *Entwicklungsstadien, Dauer der Einwirkung von 0,2 mol TRZ, sowie Darstellungsverfahren zu den in Abb. 27 abgebildeten Anlagerungsmustern der Bildungsmembran.*

Stadium	Minuten des Aufenthaltes in 0,2 mol TRZ	Darstellungsverfahren
A	120	Osmiumsäure-fixiert
C	110	Osmiumsäure-fixiert
E	60	Osmiumsäure-fixiert
G	60	Osmiumsäure-fixiert
J	100	Osmiumsäure-fixiert
M	90	lebend, Neutralrotfärbung
N	60	Osmiumsäure-fixiert
O	90	lebend, Neutralrotfärbung
P-Q	60	Osmiumsäure-fixiert
R	8	Osmiumsäure-fixiert

Stadium der Entwicklung abhängig. Abb. 27 zeigt die nach photographischen Aufnahmen gezeichneten Muster von zehn verschiedenen Entwicklungsstadien. In Tab. 2 sind die dazugehörenden Werte und Darstellungsverfahren zusammengefaßt.

Das Stadium in Tab. 2 bzw. Abb. 27 bezeichnet stets den Zustand der Formentwicklung, der erreicht war, als der Turgor entfernt wurde.

Die Anlagerungsmuster der Bildungsmembran sind meist auch an ungefärbten, lebenden Zellen sichtbar (vgl. Abb. 28, Abb. 32, Abb. 34). Zur besseren Kontrastierung bei der photographischen Darstellung war es aber in

[3a] Waris (1951) hat die verdickte Bildungsmembran besonders an kernlosen Zellen bzw. in höher konzentrierter Kulturlösung bereits beobachtet und gefärbt. Die Bedeutung des Turgordruckes wurde aber noch nicht erkannt.

vielen Fällen notwendig, die Zellen entweder mit Neutralrot vital zu färben, oder aber mit 1% Osmiumsäure zu fixieren. Leider ging bei der Fixierung der elegante Schwung der Kurven oft verloren.

Mit Neutralrot (1 : 6000, 0,2 mol TRZ, gelöst in Aqua dest.) färbte sich die verdickte Bildungsmembran einheitlich rot an. Brillantcresylblau (1 : 6000, gelöst in Aqua dest. + 0,2 mol TRZ) färbte die Bildungsmembran blauviolett. Acridinorange (1 : 6000, gelöst in Aqua dest. + 0,2 mol TRZ) ergab eine gelbe Hellfeldfärbung und eine kupferrote Fluoreszenz. Mit Rhodamin B (1 : 6000, gelöst in Leitungswasser — 0,2 mol TRZ) trat keine Anfärbung der verdickten Membran ein.

In Abb. 27 ist zu erkennen, daß jeder Lappen in der Phase, bevor er sich aufspaltet, mit zwei Membran-Maxima wächst, die ein Membran-

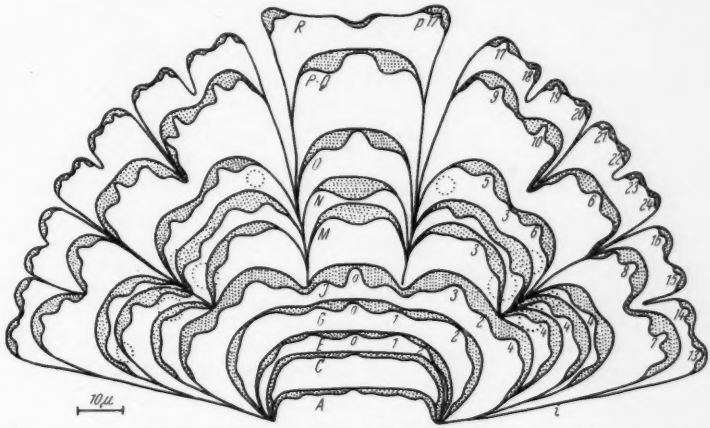


Abb. 27. Die Anlagerungsmuster der Bildungsmembran in zehn verschiedenen Stadien der Formdifferenzierung, wie sie nach Einlegen in 0,2 mol TRZ sichtbar werden. Die Bilder wurden nach photographischen Aufnahmen gezeichnet. Die genauen Angaben zu den einzelnen Stadien sind in Tab. 2 zusammengefaßt. Näheres im Text.

Minimum einschließen. Am deutlichsten sieht man das am Mittellappen 1, 1. Das Membran-Minimum entspricht der Stelle, wo später der Einschnitt entsteht. Es kann daher mit derselben Zahl bezeichnet werden wie der Einschnitt (vgl. Abb. 2). Ein Membran-Maximum läßt sich dann gut durch die zwei Zahlen bezeichnen, die es einschließen. Das Membran-Maximum 2,3 (Abb. 27 *J*) enthält z. B. das Material für den Lappenteil 2,3 (Abb. 2).

In den frühesten Stadien der Entwicklung (*A* und *C* in Abb. 27) ist nur das Membran-Minimum *O* (Null) deutlich — die Stelle, wo die längste Verbindung zwischen den beiden Tochterzellen besteht, ehe sie vom diaphragmaartig wachsenden Septum unterbrochen wird. Ungefähr erst im Stadium *E* werden auch die Membran-Minima 1 und 2 erkennbar. Zwischen ihnen differenzieren sich dann die ersten Membran-Maxima heraus.

Wenn sich ein Lappen einschnürt, so ist dies die Folge der Aufspaltung des Membran-Minimums. Im Lappen 1,2 spaltet sich z. B. 3 in 5 und 6 auf. Während an den Membran-Minima die Substanzanlagerung anscheinend nur verringert ist, erfolgt am ehemaligen Ort des Minimums nach der Aufspaltung überhaupt keine mehr. So entsteht an dieser Stelle die Einschnürung.

Daß es sich hier um eine Aufspaltung der Membran-Minima und nicht der Membran-Maxima handelt, ergibt sich aus der Betrachtung von Übergangsstadien, z. B. Stadium *N* in Abb. 27, Lappen 1,2. Die Membran-Maxima 2,3 und 1,3 sind hier noch vorhanden, während die späteren 3,5 und 3,6-Maxima verwachsen erscheinen. Hätten sich 2,3 und 1,3 gespalten, so wäre die Verwachsung nicht am Ort von 3 erfolgt und 2,3 sowie 1,3 nicht so deutlich ausgeprägt.

Die Aufspaltung der Seitenlappen-Minima dürfte für die Gattung *Micrasterias* charakteristisch sein. Es wäre eine reizvolle Aufgabe, die räumlichen und zeitlichen Unterschiede bei den einzelnen Arten zu untersuchen.

Anders verhält sich der Mittellappen 1,1 (vgl. Abb. 27). Hier bleibt das Membran-Minimum *O* bis gegen Ende der Formdifferenzierung unaufgespalten erhalten, läßt in den späteren Stadien aber eine Verbreiterung erkennen (*P*—*Q*). Die Art und Weise, wie dieses Breiterwerden erfolgt, bedingt anscheinend die geschwungene Kontur des Mittellappens (vgl. Abb. 2, Abb. 5). Schließlich kommt es doch noch zu einer Art Aufspaltung, die zur Bildung der letzten feinen Zacken führt. In der Verlegenheit um eine bessere Bezeichnung wurde der Einschnitt zwischen diesen Zacken mit *p* 17 (para-17) bezeichnet.

Es sei erwähnt, daß an den radiären Membranen der Einschnitte auch kleinere Neben-Maxima auftreten, z. B. deutlich am Einschnitt *i*, die in der Nomenklatur nicht berücksichtigt worden sind. Ferner muß darauf hingewiesen werden, daß die Membranverdickungen ja in Wirklichkeit drei-

Abb. 28. Anlagerungsmuster der Bildungsmembran in Stadium *G*, nach 2¼ Stunden in 0,2 mol TRZ (Phako. Öl-Im.).

Abb. 29. Die Zellen aus Abb. 28, 3½ Stunden in 0,2 mol TRZ (Phako. Öl-Im.).

Abb. 30. Die Zellen aus Abb. 28, 5¼ Stunden in 0,2 mol TRZ (Phako. Öl-Im.).

Abb. 31. Die Zellen aus Abb. 28 am nächsten Tag. Näheres im Text (Hellfeld, Öl-Im.).

Abb. 32. Stadium *I*—*J* nach fünf Stunden Aufenthalt in 0,2 mol TRZ. Die Membranmaxima sind teilweise verwachsen, die Dauermembran ist bereits gebildet (Hellfeld, Öl-Im.).

Abb. 33. Stadium *D*, kurzfristig mit 0,3 mol TRZ plasmolysiert, dann in 0,2 mol TRZ deplasmolysiert und in dieser Konzentration liegen gelassen. Aufnahme nach neun Stunden (Hellfeld, Öl-Im.).

Abb. 34. Stadium *I*, zwei Stunden in 0,2 mol TRZ (Hellfeld, Öl-Im.).

Abb. 35. Dieselben Zellen wie in Abb. 34 nach dem Durchsaugen von Standortwasser. Die rechte Zelle ausgeronnen. Näheres im Text (Hellfeld, Öl-Im.).

Abb. 36. Stadium *K*, eine Stunde in 0,2 mol TRZ gelegen, dann vorsichtig mit 0,3 mol TRZ plasmolysiert. Im Ultramikroskop erscheinen die ganz feinen Fäden, mit denen das Plasma an der Bildungsmembran haftet (Öl-Im., Aplanatischer Dunkelfeld-Kond., Bogenlicht).

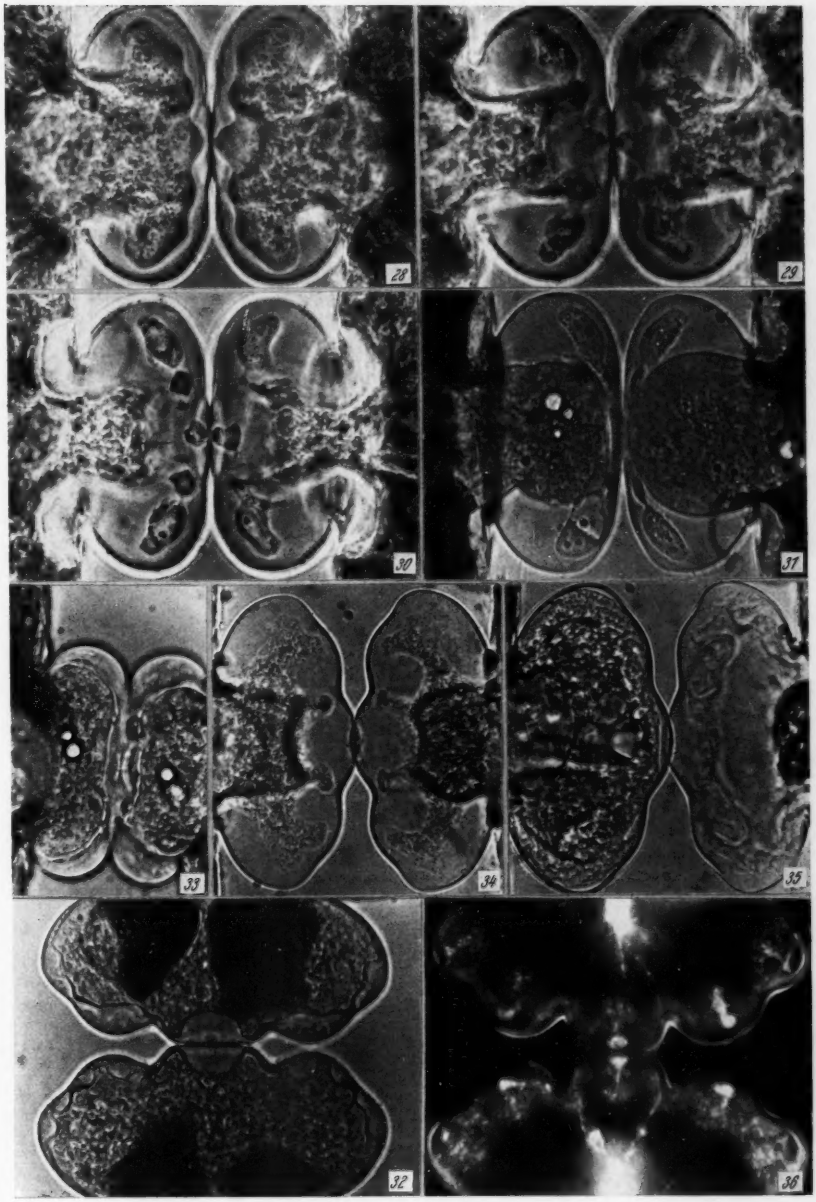


Abb. 28 bis Abb. 36.

dimensionale Ausmaße haben, die mikroskopisch schwer erfaßt werden können. So bilden die beiden Maxima 0,1 eine Verdickung, die ringförmig um *O* verläuft. Bei längerem Verweilen im turgorlosen Zustand wächst der Hohlraum dieses Ringes zu (vgl. Abb. 27 *M, N,* Abb. 32, Abb. 34). Ebenso bilden die Maxima 1,3 und 2,3, ferner 2,4 und 4 *i* samt Nebenmaximum dreidimensionale Verdickungen, die in der unteren Zelle von Abb. 32 erkennbar, in der oberen Zelle bereits teilweise zusammengewachsen sind. Ihre räumliche Gestalt ist sehr schwer zu beschreiben. In Abb. 28 sind große vom Einschnitt *i* gewachsene Verdickungen sichtbar. In Abb. 27 *O* und *N* ist die Lage ähnlicher Verdickungen durch punktierte Kreise angedeutet.

Was geschieht nun im Verlaufe der Anlagerung? Bei ganz frühen Stadien (etwa *A* bis *C*) wird die Produktion der Bildungsmembran nur kurze Zeit fortgesetzt, nachdem die Zellen in 0,2 mol TRZ gebracht worden sind. Man kann hier kaum stärkere Verdickungen erzielen, als sie Abb. 27 *A* und *C* zeigt. Etwa vom Stadium *C* an läßt sich die Produktion der Bildungsmembran anscheinend nicht mehr aufhalten, und es kommt zur Anlagerung des gesamten Materials. Da das Volumen der neuen Zellhälfte nicht mehr zunimmt, wird damit ihr ganzer Rauminhalt angefüllt, wobei das Material sogar in die alte Zellhälfte „überfließen" kann (Abb. 30). Besonders bei mittleren Stadien ist deutlich, daß die Bildungsmembran in stärkerer Schichtdicke ihr regelmäßiges Muster verliert und unförmig abgelagert wird (Abb. 28, Abb. 29, Abb. 30). Nach Beendigung der Ablagerung vermag das Protoplasma die Bildungsmembran zumindest teilweise wieder aufzulösen, wie in Abb. 31 gezeigt ist.

Wurde eine Zelle mit 0,3 mol TRZ kurzfristig plasmolysiert, so daß eine deutliche Ablösung des Plasmas von der Bildungsmembran zu beobachten war und dann mit 0,2 mol TRZ wieder deplasmolysiert, so kam es wohl noch zu einer verminderten Ablagerung von Bildungsmembran, ein Muster aber war kaum zu erkennen (Abb. 33).

b) Eigenschaften der Bildungsmembran

Die Bildungsmembran unterscheidet sich in mancher Hinsicht von der Dauermembran. Das soll die folgende Gegenüberstellung erläutern.

Bildungsmembran	Dauermembran
Nach Durchsaugen von Chlorzinkjodlösung sofort Blauviolett-Färbung	ohne Vorbehandlung keine Zellulosereaktion nach Chlorzinkjodbehandlung
Nur ganz geringes Aufleuchten zwischen den gekreuzten Nikolschen Prismen	starkes Aufleuchten zwischen den gekreuzten N. Prismen
Stark dehnbar	kaum dehnbar

Von der Dehnbarkeit auch der verdickten Bildungsmembran kann man sich leicht überzeugen, wenn man bei einer längere Zeit in 0,2 mol TRZ gelegenen Zelle Standortwasser durchsaugt. Aus den nicht dehnbaren alten Zellhälften wird dabei das Plasma mit großer Kraft in die neuen Hälften hineingepreßt, die sich beträchtlich vergrößern. Abb. 34 zeigt neue Zell-

hälften, die bereits zwei Stunden in 0,2 mol TRZ liegen. Die Bildungsmembran ist sehr stark verdickt. In Abb. 33 sind dieselben Zellen dargestellt, nachdem Standortwasser durchgesaugt worden war. Die rechte Zelle hat die Behandlung nicht überstanden, ist geplatzt und ausgeronnen. Man erkennt deutlich den Größenunterschied zwischen den beiden Zellen. Bemerkenswert ist das Verhalten der Bildungsmembran. Die starken Verdickungen in Abb. 34 erscheinen bei der lebenden Zelle in Abb. 33 zu einem dünnen peripheren Saum zusammengepreßt. Es erhebt sich hier die Frage, womit denn an diesem im hohen Grade plastischen Material die äußere Zellkontur aufrecht erhalten wird. Wahrscheinlich hat die äußere Oberfläche der Bildungsmembran, die noch bei normalem Turgordruck entstanden ist, eine höhere Festigkeit.

Bei den vielen in 0,2 mol TRZ beobachteten Zellen fiel auf, daß die Schichtdicke der angelagerten Bildungsmembran nach gleichen Zeiträumen und auch bei gleichen Stadien oft ungleich war. Vermutlich ist dies die Folge von doch noch vorhandenen Druckunterschieden, die etwa in geringen Verschiedenheiten des osmotischen Wertes ihre Ursache haben können. Die Substanz der Bildungsmembran wird anscheinend in der völlig turgorlosen Zelle weniger dicht angelagert, als bei Zellen, in denen noch ein geringer Turgordruck herrscht. Dies stimmt gut mit der Auffassung überein, daß die unter normalen Druckbedingungen entstandene äußere Oberfläche der Bildungsmembran eine höhere Festigkeit besitzt, d. h. dichter ist, als die im turgorlosen Zustand weiter innen angelagerten Bereiche.

Unter Umständen erscheint auch bei schwach plasmolytisch wirkenden TRZ-Konzentrationen nur die Bildungsmembran verdickt, weil sie auf Grund ihrer plastischen Eigenschaften einfach vom sich zurückziehenden Plasma in die Dicke gezerrt wird. Bei vorsichtig ausgeführter, langsamer Plasmolyse mit höheren TRZ-Konzentrationen haftet das Plasma in Form vieler feiner Fäden, die besonders im Ultramikroskop deutlich sind (Abb. 36) an der Bildungsmembran. Eine Grenzkontur zwischen Plasma und Substanz der Bildungsmembran kann unter diesen Umständen nicht mehr wahrgenommen werden. Nach plötzlicher Plasmolyse mit höheren Konzentrationen ist dagegen die innere Kontur der Bildungsmembran, auch nach dem Absterben der Zelle, meist klar zu erkennen.

3. Veränderungen der Formbildung bei turgorverminderten Zellen

Die Anwendung von TRZ-Konzentrationen im Bereich von 0,10 bis 0,15 mol (vgl. Tab. 1) führte stets zu einer verminderten Volumsvergrößerung, verbunden mit abnormer Formbildung. Formveränderungen dieser Art können als „Turgomorphosen" zusammengefaßt werden.

Bei der Einwirkung auf frühe Stadien (etwa von *A* bis *G*) kam es meist zu unregelmäßigen Formbildungen, wie sie in Abb. 37 bis Abb. 40 dargestellt sind. Die genauen Angaben zu den Bildern finden sich in der Legende. Die auffallend unregelmäßige Bildung in Abb. 37 war ein sehr frühes Stadium. Wie Abb. 38 und Abb. 40 zeigt, vergrößerte sich eine Tochterzelle

oft mehr als die andere. Gelegentlich wurde ein kappenförmiges Abheben der verdickten Bildungsmembran beobachtet, wie dies in Abb. 40 angedeutet ist.

Bei der Einwirkung auf spätere Stadien, in denen bereits die Einschnürungen deutlich sind (etwa ab *H*), war die Volumszunahme nur auf einzelne Lappen beschränkt, die dann aber eine übermäßige Aufblähung erfuhren (Abb. 41 bis Abb. 43). Die Symmetrie der Zellen blieb dabei meist erhalten. Bemerkenswert war die Feststellung, daß manchmal der Mittellappen (Abb. 43), in anderen Fällen die Seitenlappen (Abb. 42) Vergrößerungen zeigten, obwohl beim Beginn der Behandlung nahezu gleiche Stadien vorlagen.

In allen Fällen ließen die nicht entwickelten Lappen oder Lappenteile Verdickungen der Bildungsmembran erkennen, mit dem für den jeweiligen Entwicklungszustand charakteristischen Anlagerungsmuster. In Abb. 44 und Abb. 45 sind die 2 *i*-Lappen der Abb. 41 und Abb. 42 stärker vergrößert dargestellt. In beiden Fällen ist innen bereits die Dauermembran angelagert.

Es muß besonders betont werden, daß die durch Turgoränderung morphologisch stark veränderten Zellen (z. B. Abb. 41, Abb. 42, Abb. 43) normal lebensfähig waren und durch viele Tage im abgeschlossenen Präparat lebend beobachtet werden konnten.

4. Veränderungen der Formbildung nach zeitweiliger Ausschaltung des Turgordruckes

Wurde bei Zellen, deren Volumszunahme mit 0,2 mol TRZ verhindert worden war, vorsichtig wieder Standortwasser durchgesaugt, so setzte die Volumszunahme wieder ein, und die Formbildung ging nach einem Zeitraum der Unterbrechung weiter. In den Versuchen erfolgte diese Unterbrechung für 1—2 Stunden bei Zimmertemperatur. Wurde hiebei an späteren Stadien der für die Formdifferenzierung zur Verfügung stehende Zeitraum überschritten, war natürlich keine weitere Formveränderung mehr wahrnehmbar.

Stadien ohne Einschnürungen (etwa bis *G*) blieben nach dieser Behandlung auf frühen Differenzierungsstadien stehen oder zeigten starke Deformationen (Abb. 46, Abb. 47).

Abb. 37. Endzustand eines in 0,15 mol TRZ gewachsenen frühen A-Stadiums (Hellfeld).

Abb. 38. *C*-Stadium, sechs Stunden in 0,15 mol TRZ gewachsen (Hellfeld, Öl-Im.).

Abb. 39. *E*-Stadium, acht Stunden in 0,125 mol TRZ gewachsen (Hellfeld).

Abb. 40. Endzustand eines in 0,15 mol TRZ gewachsenen *G*-Stadiums (Hellfeld, Öl-Im.).

Abb. 41. Endzustand eines in 0,15 mol TRZ gewachsenen *L*-Stadiums (Hellfeld).

Abb. 42. Endzustand eines in 0,15 mol, TRZ gewachsenen *M*-Stadiums (Hellfeld).

Abb. 43. Endzustand eines in 0,15 mol TRZ gewachsenen *M*-Stadiums (Hellfeld).

Abb. 44. Nicht entwickelte Seitenlappen der Abb. 41, stärker vergrößert (Hellfeld, Öl-Im.).

Abb. 45. Nicht entwickelte Seitenlappen der Abb. 42, stärker vergrößert (Phako. Öl-Im.).

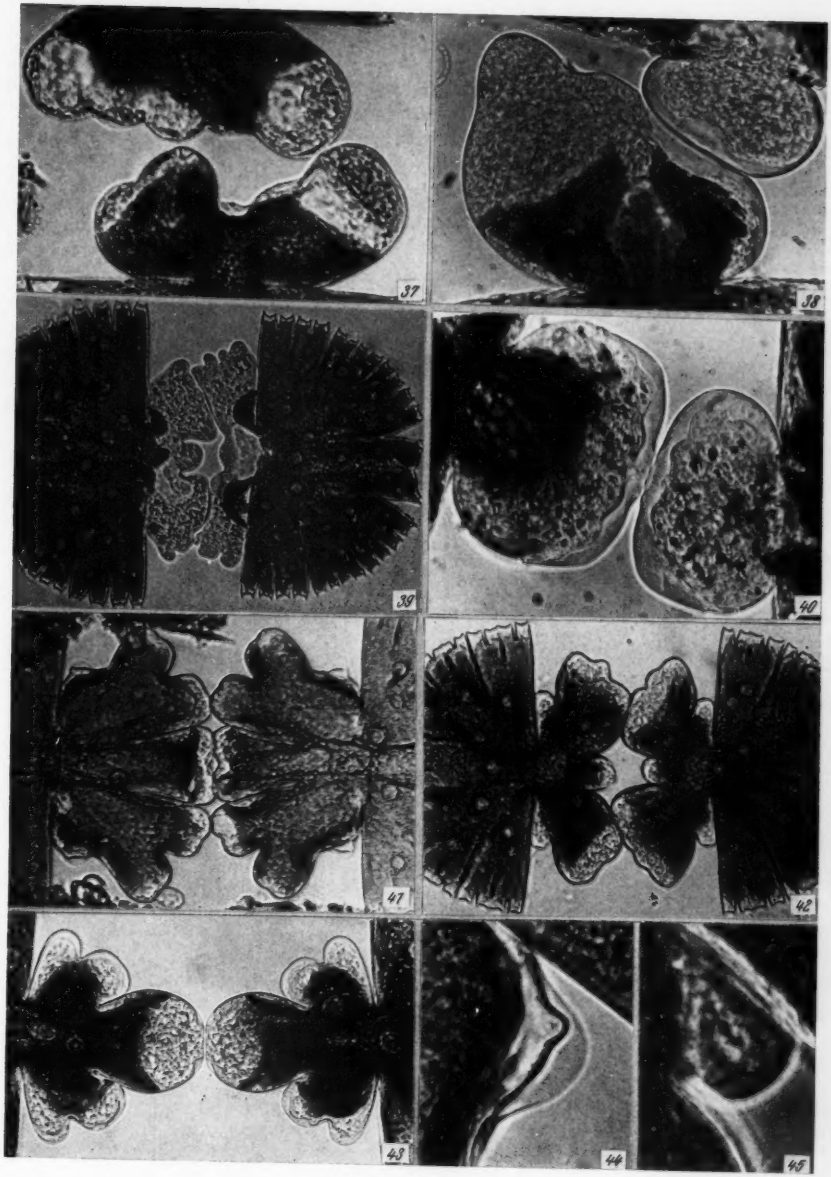


Abb. 37 bis Abb. 45.

Bei Stadien, die bereits Einschnürungen und Lappen erkennen ließen, kam es regelmäßig zur Bildung dreidimensionaler Verdoppelungen an den Seitenlappen (Abb. 48, Abb. 49, die genauen Werte stehen in der Legende). Naturgemäß lagen die Ansatzstellen der Lappenverdoppelungen um so tiefer, je frühere Stadien behandelt wurden. Die im *I*-Stadium behandelten Zellen der Abb. 48 zeigen dies deutlich gegenüber der Abb. 49, wo ein *J*-Stadium vorlag. In Abb. 50 ist der Fall eines relativ späten Stadiums (*O*) dargestellt, wo die Entwicklung zur Verdoppelung der Lappen nur mehr angedeutet ist, weil für die weitere Ausbildung keine Zeit mehr zur Verfügung stand.

Die Erklärung für die Lappenverdoppelungen ist relativ einfach: Bei der neuerlichen Volumszunahme ist dem weiterwachsenden Lappen die verdickte, zusammengepreßte Schicht der Bildungsmembran im Wege. Er muß daher nach oben und unten ausweichen. Auf Abb. 49 sind die Konturen der verdickten Membran deutlich erkennbar.

Dieses Ausweichen nach Unterbindung der Volumszunahme durch Turgorverminderung kann anscheinend für das Wachstum anderer Zellen verallgemeinert werden. So zeigten Wurzelhaare von *Lepidium sativum*, die für einige Zeit in eine zellsaftisotonische TRZ-Lösung und dann wieder in Wasser gebracht worden waren, oft ähnliche Bildungen (Abb. 52) und sogar Verzweigungen.

In diesem Zusammenhang soll noch auf Versuche von Gorter (1949) hingewiesen werden, der es gelang, mittels 2, 3, 5-Trijodbezoesäure bei *Lepidium*-Wurzelhaaren eine Hemmung des Längenwachstums bei gleichzeitiger fortgesetzter Bildung von unregelmäßig verteiltem Zellulosematerial hervorgerufen. Ein solcher Effekt wurde hier durch bloß osmotische Einwirkung erzielt.

Dreidimensionale Verdoppelungen der Lappen von *Micrasterias*-Arten finden sich auch in der Natur und wurden schon von West und West (1905) beschrieben (vgl. auch Krieger 1937, Heimanns 1942). Kallio (1951) hat sie regelmäßig an diploiden Zellen beobachtet, die er nach Zentri-

---

Abb. 46. Endzustand, *E*-Stadium, 1½ Stunden in 0,2 mol TRZ, dann Standortwasser Hellfeld).

Abb. 47. Endzustand, *D*-Stadium, zwei Stunden in 0,2 mol TRZ, dann Standortwasser (Hellfeld, Öl-Im.).

Abb. 48. Endzustand, *I*-Stadium, eine Stunde in 0,2 mol TRZ, dann Standortwasser (Hellfeld).

Abb. 49. Endzustand, *J*-Stadium, eine Stunde in 0,2 mol TRZ, dann Standortwasser (Hellfeld).

Abb. 50. Endzustand, *O*-Stadium, eine Stunde in 0,2 mol TRZ, dann Standortwasser (Hellfeld).

Abb. 51. *L*-Stadium, eine Stunde in 0,2 mol TRZ, dann eine Stunde Standortwasser, dann wieder eine Stunde 0,2 mol TRZ, schließlich Osmiumsäure-Fixierung (Hellfeld, Öl-Im.).

Abb. 52. Spitze eines Wurzelhärchens von *Lepidium sativum* mit lokalen Zellwandverdickungen. Die Zellen lagen für einige Stunden in einer zellsaft-isotonischen TRZ-Lösung.

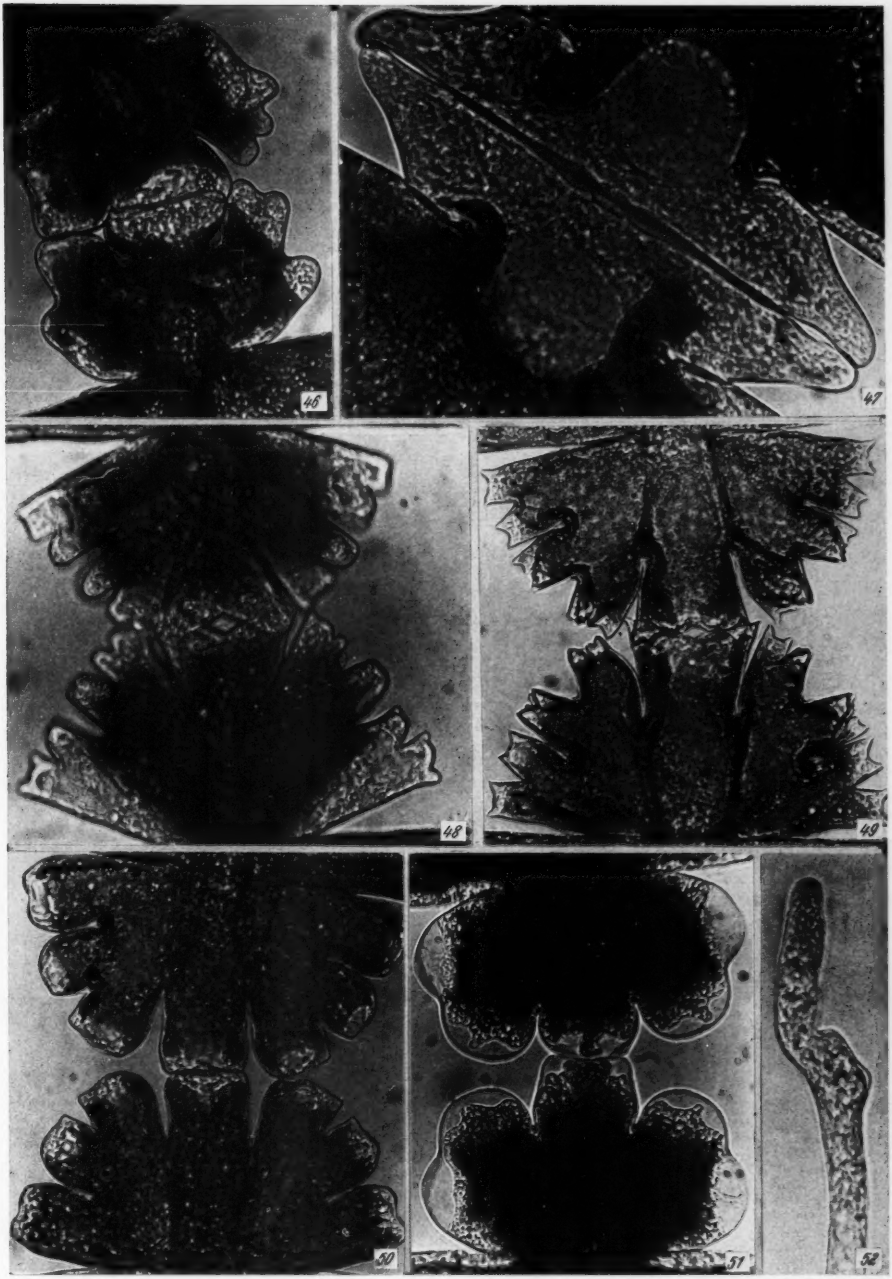


Abb. 46 bis Abb. 52.

fugierung kurz nach der Kernteilung künstlich erzeugen konnte. Vermutlich hat ein lokales Überangebot an Bildungsmembran-Substanz, das durch die doppelte Kernmasse verursacht wird, eine ähnliche Wirkung wie die Verdickungszonen nach Turgordruck-Entfernung.

Wurden Zellen, die für eine Stunde in 0,2 mol TRZ, dann für eine weitere Stunde in Standortwasser gebracht worden waren, erneut in 0,2 mol TRZ eingelegt, so lagerten sich die Verdickungszonen der Bildungsmembran der zweiten Turgordruck-Entfernung auf die der ersten (Abb. 51). Zum Zeitpunkt dieser Anlagerung hätte die letzte feine Formdifferenzierung der Lappen stattgefunden, wenn die Zelle nicht gestört worden wäre. Wie man aber in Abb. 51 sieht, wurde trotzdem ein Muster angelagert, das etwa dem Stadium *M* (vgl. Abb. 27) entspricht. Nur in dem größeren Mittellappen ist ein Muster sichtbar, das einem etwas späteren Entwicklungszustand angehört. Dieser Versuch zeigt noch eindringlicher, als die schon beschriebenen (vgl. Abschnitt IV, 3), daß in einem zurückgebliebenen Lappen kein höher differenziertes Muster entfaltet werden kann, als seinem durch die Kontur bestimmten Entwicklungszustand entspricht. Die Änderung des Musters im Verlaufe der Formdifferenzierung scheint daher ein von der Zeit nur bedingt abhängiger Vorgang zu sein.

V. Der Einfluß von Wirkstoffen auf die Formbildung

Wie bekannt, verursachten verschiedene Wirkstoffe bei höheren Pflanzen mannigfaltige morphologische Veränderungen. Neben der als Zellstreckungshormon bekannten Indol-3-essigsäure (IES) ist vor allem die 2,3,5-Trijodbenzoesäure (TIBA) besonders wirksam (Literaturübersicht vgl. Kiermayer 1961). Im folgenden wurde untersucht, inwieweit IES und TIBA in der Lage sind, den Formbildungsprozeß auch bei der einzelligen *Micrasterias rotata* zu beeinflussen. Dazu kamen verschiedene Teilungsstadien in

Abb. 53. 10^{-3}% IES auf St. *A*, Endzustand.
Abb. 54. 10^{-3}% IES auf St. *E*, Endzustand.
Abb. 55. 10^{-2}% TIBA auf St. *A*, Endzustand.
Abb. 56. 10^{-2}% TIBA auf St. *Q*, Endzustand.
Abb. 57. Zelle, die im St. *F* von ihrer Schwesterzelle getrennt wurde, Endzustand.
Abb. 58. Fingerförmige Lappen, bewirkt durch das Ausrinnen der Schwesterzelle (intensive Lichtbestrahlung der alten Zellhälfte im St. *L*), Endzustand.
Abb. 59. Die Entwicklung wurde im St. *E* für sechs Stunden durch Überführung in eine Temperatur von $+2^{0}$ C unterbrochen.
Abb. 60. Das Präparat mit der Zelle lag vom sehr frühen *A*-Stadium an auf einer mit der Frequenz von 50 Hz vibrierenden Unterlage, Endzustand.
Abb. 61. Vom St. *A* an dauernd mäßig beleuchtete Zelle der Beobachtungsreihe Nr. 1 (vgl. Abschnitt III, 4 f.), Endzustand.
Abb. 62. Vom St. *A* an dauernd mäßig beleuchtete Zelle der Beobachtungsreihe Nr. 2,
Abb. 63. Eine in der Kultur aufgetretene Form-Anomalie, Endzustand.
Abb. 64. Die abnorme Zellhälfte einer in der Natur gefundenen Form-Anomalie hat eine normale Tochterhälfte gebildet, Endzustand.
Abb. 65. In der Natur gefundene hypertrophische Anomalie des Mittellappens.
Abb. 66 und Abb. 67. In der Kultur aufgetretene kernlose Tochterzellen.

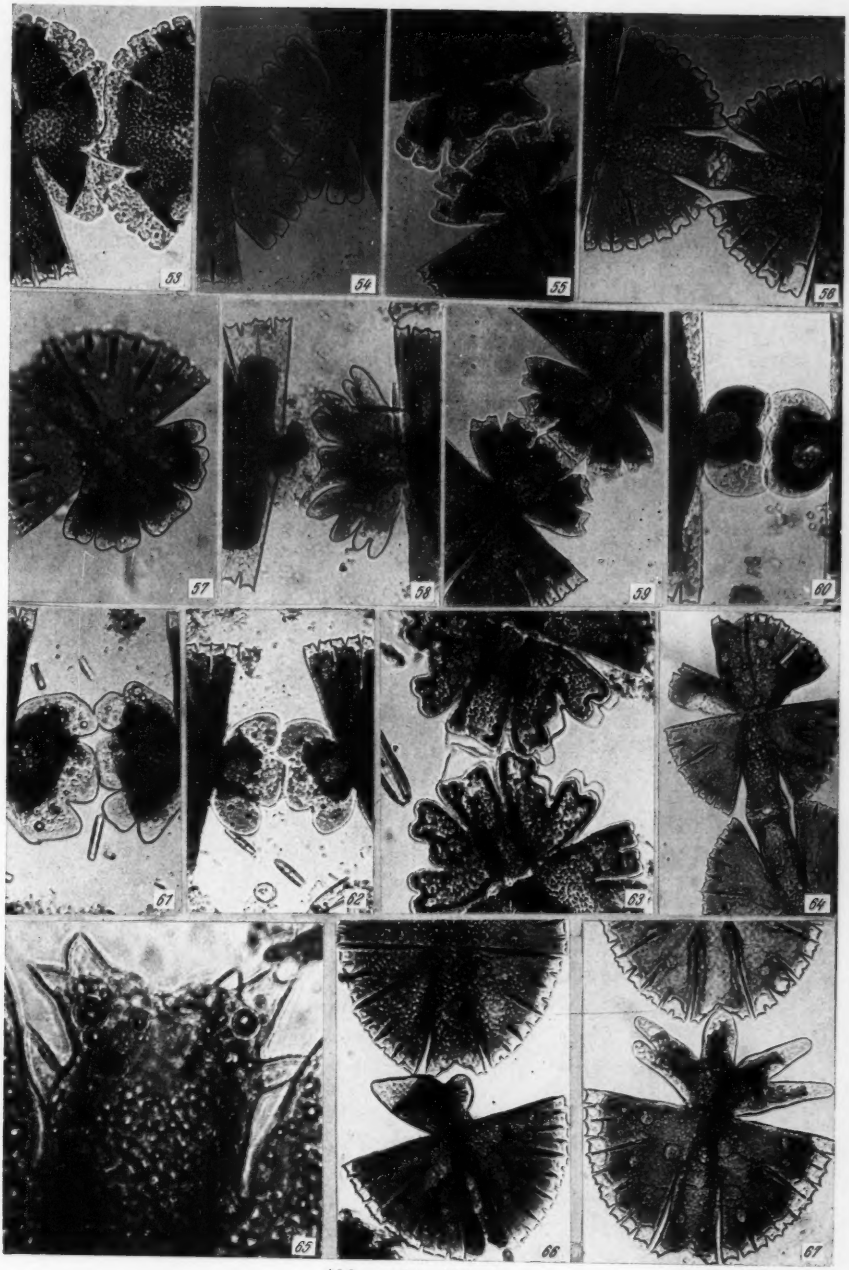


Abb. 53 bis Abb. 67.

wäßrige Lösungen der beiden Stoffe (Konzentration von 10^{-1}% bis 10^{-4}%), so daß sich die Formbildung der neuen Halbzellen unter einem bestimmten Wirkstoffmilieu abspielen konnte.

IES (Na-Salz) bewirkte in den Konzentrationen von 10^{-1}% bis 10^{-3}% in allen Fällen eine Hemmung der Lappendifferenzierung, insbesondere des Mittellappens (Abb. 33). Bei der Behandlung junger Teilungsstadien trennten sich die wachsenden Mittellappen nur unvollkommen voneinander. Außerdem kam es zu einem „Anschmiegen" der beiden jungen Zellhälften (Abb. 33, Abb. 34). IES in einer Konzentration von 10^{-4}% ergab zum Teil normale Halbzellen, zum Teil aber auch stärkere Morphosen.

Auch die TIBA bewirkte in Konzentrationen von 5.10^{-2}% bis 10^{-3}% eine Beeinflussung der Formdifferenzierung. Wie die Abb. 35 zeigt, kam es wieder zu einem abnormen Zusammenhaften der Mittellappen beider Halbzellen und dem charakteristischen „Anschmiegen". Der Wirkstoffeinfluß machte sich hier vor allem bei den mittleren Stadien bemerkbar, während ältere weniger beeinflußt wurden (vgl. Abb. 36).

Über die Wirkung der beiden Stoffe kann zusammenfassend gesagt werden, daß keiner der beiden einen spezifisch „formbildenden" oder wachstumsfördernden Einfluß ausübte. Beide Stoffe (d. h. sowohl der Wuchsstoff IES als auch der Hemmstoff TIBA) führten zu Wachstumsstörungen. Es scheint daher sehr wahrscheinlich, daß es sich bei den beschriebenen wirkstoffbedingten Morphosen um eine allgemeine Zellschädigung handelt, die sich auch im Differenzierungsprozeß der sich neubildenden Halbzellen auswirkt.

Auch Waris (1951) konnte feststellen, daß IES in Konzentrationen von 10^{-3} bis 10^{-4}% (mit welchen auch wir unsere Versuche anstellten) bei Zellen mit Zellkern keine formative Wirkung zeigte. Er machte jedoch die interessante Beobachtung, daß künstlich kernlos gemachte Zellen nach Einwirkung von IES ein verstärktes Wachstum der sich abnorm entwickelnden Halbzelle aufweisen. Dabei handelte es sich jedoch nicht um eine spezifische Wirkung von IES, sondern kernlose Zellen reagierten auch unter dem Einfluß ganz verschiedener Stoffe wie z. B. Na-Jodacetat, Acetylcholinjodid, Histamin, Thymonucleinsäure und anderen mit einem stark wachstumfördernden Effekt auf die Lappen der sich abnorm differenzierenden Halbzelle.

VI. Der Einfluß anderer Außenfaktoren auf die Formbildung

Die Formbildung ist ein ungemein empfindlicher Vorgang, bei dem geringste Störungen von außen bereits ein Abweichen von der Norm auslösen können. Im folgenden sollen einige Versuche dieser Art besprochen werden.

Abb. 37 zeigt eine Zelle, die schon im Stadium *F* von ihrer Schwesterzelle getrennt worden war. Man erkennt eine Hemmung, daneben aber auch eine abnormale Differenzierung besonders des 1, 2-Lappens. Dieser Versuch weist auf eine Beziehung zwischen den beiden Tochterzellen hin. Die völlig normale Entwicklung setzt anscheinend das Vorhandensein der angrenzenden Schwesterzelle voraus.

In Abb. 38 ist eine Zelle dargestellt, die sich im Milieu des ausgeronnenen Zellinhaltes ihrer Schwesterzelle entwickelt hatte. Die alte Hälfte der lin-

ken Zelle war im Stadium *L* intensiv mit Licht bestrahlt worden, so daß sie bald darauf nekrotisch wurde und platzte. Ähnliche fingerförmig gestaltete Lappen können auch gelegentlich bei Zellen gefunden werden, die in der Natur vorkommen. Nach Waris (1933) treten sie in einer Kulturlösung auf, die bloß 0,001% $CaCl_2$ enthält.

Bei allen in dieser Arbeit beschriebenen Beobachtungen herrschte Zimmertemperatur. Junge Tochterzellen, die im Stadium *E* für 6 Stunden von $+20^0$ C auf $+2^0$ C gebracht worden waren, blieben für diese Zeit auf dem Differenzierungszustand des Stadiums *E* stehen. Wieder in Zimmertemperatur gebracht, entwickelten sie sich zu dem in Abb. 59 dargestellten Endzustand. Eine mit Hemmung verbundene abnormale Formdifferenzierung ist deutlich. Man beachte die Ähnlichkeit der beiden Tochterzellen, die auf die Gesetzmäßigkeit auch der gestörten Formbildung hinweist.

Die Tochterzellen, die in Abb. 60 gezeigt sind, entwickelten sich vom frühesten *A*-Stadium an unter dem Einfluß einer 50-Hz-Vibration. Das Präparat wurde einfach an einem mit Wechselstrom betriebenen Aquariendurchlüfter befestigt. Die abnorm gehemmten Tochterzellen zeigen eine Lagebeziehung, wie sie sonst nur bei den Mittellappen vorkommt (vgl. Abb. 5). In späteren Stadien konnte durch die Vibration keine auffallende Beeinflussung erzielt werden.

Über die Veränderungen bei lokaler, intensiver Lichtbestrahlung wird in einer eigenen Arbeit berichtet werden. Auch mäßige, diffuse Beleuchtung zeigt einen starken Effekt, wenn sie dauernd geboten wird. So fand Kallio (1953) in dauernd beleuchteten Kulturen abnorme Formen, Verlust der Bipolarität, ungleiche Teilungen und die Entstehung diploider Zellen. In Abb. 61 und Abb. 62 sind jene Zellen dargestellt, an denen das Verhalten der Plasmabewegung bei dauernder Beleuchtung vom Stadium *A* an studiert worden war (vgl. Abschnitt III, 4 f.). Bei der Zelle in Abb. 61 fand eine gewöhnliche 60-Watt-Lampe, bei der Zelle in Abb. 62 eine Niedervoltlampe, beide mit Blau-Mattscheibe, Verwendung. Das stärkere Licht der Niedervoltlampe hatte auch den stärkeren Hemmeffekt.

Mit der großen Lichtempfindlichkeit der Formdifferenzierung mag es zusammenhängen, daß sich die Zellen normalerweise nur in der Nacht teilen. Wenn auch diffuses Tageslicht kaum eine nennenswerte Wirkung haben dürfte, so muß beim direkten Sonnenlicht doch mit der Möglichkeit einer Störung gerechnet werden. In seichten Moor-Schlenken sind die Zellen ja häufig dem direkten Sonnenlicht ausgesetzt.

Was die pH-Abhängigkeit betrifft, so fand schon Pringsheim (1930) eine mangelhafte oder verkrüppelte Ausbildung der Zellhälften, wenn die Kulturlösung zu sauer ist. Bei Ca-Abwesenheit konnte er wie auch schon Waris (1926) keine Teilungsbereitschaft beobachten.

VII. Spontane Formbildungsänderungen

Auch in der Natur finden sich häufig abnorme Zellformen bei *Micrasterias*, wie sie bereits von West and West (1905), Gistl (1914), Ducellier (1915, 1918), Dick (1919, 1926), Homfeld (1929), Laporte (1931), Krieger (1937), Lefèvre (1939), Heimans (1942) u. a. beschrieben

worden sind. Ducellier (1915) unterschied Teilungsanomalien und Formanomalien. Bei den Teilungsanomalien wird die Trennung der beiden Zellhälften gestört, so daß verwachsene Tochterzellen entstehen, die zwei Kerne in einem Plasmaraum enthalten. Wie Kallio (1951) ausführlich gezeigt hat, beruhen die Teilungsanomalien auf der Nichtausbildung des Septums. Besonders durch Kältebehandlung bei Teilungsbeginn konnte er sie künstlich erzeugen (vgl. Abschnitt IV, 1).

Laporte (1931) unterschied bei den Formanomalien zwischen „atrophischen" und „hypertrophischen" Zellen. Die „atrophischen" Zellen lassen Hemmungen in der Formdifferenzierung erkennen. Nach Krieger (1937) treten sie besonders im Herbst auf und finden sich häufig in alpinen oder polaren Regionen.

Auch wir haben an unserem Fundort durch Jahre hindurch einen hohen Prozentsatz (etwa 5%) atrophischer Zellen beobachtet. Wenn man die große Empfindlichkeit der Formbildung gegenüber Außenfaktoren berücksichtigt (vgl. Abschnitt VI), so ist dies nicht verwunderlich. Als Ursache für diese Anomalien kommen wohl Konzentrations- oder pH-Änderungen (nach Regengüssen), Temperaturstürze, Lichteinwirkungen bei kälteverzögertem Teilungsablauf und von anderen Organismen abgeschiedene Stoffe in Betracht. Ob auch eine erhöhte Radioaktivität des Moorwassers diese Anomalien verursachen kann, muß ebenfalls in den Bereich der Möglichkeit gezogen werden[4].

Es ist charakteristisch für die meisten atrophischen Formanomalien, daß sie bei neuerlicher Teilung weitgehend normale Tochterzellen bilden, wie dies schon von Gistl (1914) beobachtet wurde und wie es auch Abb. 64 zeigt. Bei den in der Natur vorkommenden Anomalien findet man auch fast immer nur eine Zellhälfte abnorm gestaltet. Natürlich kann man solche „Janus-Formen", bei denen sich eine Hälfte unter ungünstigen Bedingungen entwickelt hat, nicht als Varietäten bezeichnen (Czurda 1935). Sehr selten findet man beide Hälften deformiert.

Nach Waris (1950 b) und Kallio (1951, 1954) treten auch atrophische Formanomalien auf, die erblich sind. Waris beobachtete denselben Differenzierungsausfall durch Jahre an einem bestimmten *Micrasterias*-Stamm und sieht hier eine „Defekt-Mutation" im Rahmen einer plasmatischen Vererbung.

Da wir in unseren Versuchen die Zellen nicht weiterzüchteten, war uns eine Entscheidung darüber, ob eine Dauermodifikation vorlag oder nicht, unmöglich. In unserem Kulturgefäß gab es in bestimmten Zeiträumen nicht selten gewisse Typen von atrophischen Anomalien, z. B. solche, wie sie Abb. 63 zeigt. Es kam hier zu einem Ausfall am 1,2-Lappen, wahrscheinlich des 2,3-Maximums. Da der Ausfall bei allen vier 1,2-Lappen eingetreten ist, kann diese Veränderung nicht im Sinne von Waris (1950 b) als

[4] Nach den Angaben des Isotopenlabors der Österreichische Stickstoffwerke AG. zeigte das Wasser unseres Fundortes gegenüber gewöhnlichem Wasser eine etwa 4- bis 5fache Aktivität, die vermutlich auf den Gehalt an Rhenium 187 zurückzuführen ist.

„Defekt-Mutation" gewertet werden. Es ist aber andererseits schwer verständlich, weshalb Außenumstände gerade nur die 1,2-Lappen beeinflußt haben sollten. Da die „Defekt-Mutationen" auch remutierbar sind (vgl. Kallio 1951), ist eine strenge Grenze zwischen „Dauermodifikationen" („Defekt-Mutationen") und durch Außenumstände bewirkte Anomalien kaum zu ziehen. Vielmehr sind die „Defekt-Mutationen" gegenüber störenden Außenbedingungen als höher empfindlich aufzufassen (Waris 1950 b).

Bei den „hypertrophischen" Formanomalien tritt ein Zuviel an Lappen-Differenzierung auf. Oft erscheinen dann Membranzacken an Stellen, wo keine sein sollen (vgl. Abb. 65). Solche in der Natur vorkommende *Micrasterias*-Formen wurden bei regelmäßiger Ausbildung der Hypertrophien als eigene Varietäten zusammengefaßt (vgl. West and West 1905, Krieger 1937). Kallio (1951) fand bei diploiden Zellen dreidimensionale Lappenverdoppelungen ähnlicher Art. Daß solche Anomalien aber auch durch bloße Veränderung der Außenumstände induziert werden können, zeigen die in Abschnitt IV, 4 beschriebenen Versuche.

In zwei Fällen beobachteten wir in unserer Kultur eine Tochterzelle, die die Fähigkeit zur Formdifferenzierung weitgehend verloren hatte (Abb. 66, Abb. 67). Ähnliche Bildungen erhielten Waris (1950 b, 1951) und Kallio (1951) an Zellen, die durch Zentrifugierung kernlos gemacht worden waren. Auch wir konnten in den abgebildeten Zellen keinen Zellkern auffinden, während in der normalen Schwesterzelle ein Kern zu erkennen war. Was mit dem zweiten Kern passiert ist, konnten wir nicht feststellen. Die von Kallio (1951) beschriebenen, für diploide Zellen charakteristischen Lappenverdoppelungen waren an der normalen Tochterzelle nicht zu beobachten.

VIII. Diskussion

Aus Abschnitt IV dieser Arbeit geht klar hervor, daß bei der Formbildung von *Micrasterias* zwei wesentliche Faktoren beteiligt sind: der Turgordruck und das Membran-Anlagerungsmuster. Wird einer dieser beiden Faktoren geändert, so führt dies zu schweren Ausfallserscheinungen in der endgültigen Zellform. Das Aussehen der Zellen, die bei vermindertem Turgordruck gewachsen sind, macht dies in unzweifelhafter Weise deutlich und läßt die Funktion der beiden Faktoren erkennen: Der Turgordruck bläht die Zelle auf, das Anlagerungsmuster bestimmt den Ort an der Zelloberfläche, wo diese Aufblähung zu erfolgen hat.

Vergleicht man die wachsende Zelle mit einem Gummitier im Zustand des Aufgeblasenwerdens, so entspricht dem Turgordruck der im Inneren des Gummitieres herrschende Gasdruck. Dicke Stellen der Gummihaut werden eine geringere Blähung erfahren, als dünnere, so daß bei verschiedener Dicke der Gummihaut auch hier eine bestimmte Form entstehen kann. Die dicken bzw. dünnen Stellen in der Wand des Gummitieres können jedoch nicht mit den Membran-Maxima und -Minima der turgorlosen Zelle analogisiert werden. Denn in der turgeszenten

wachsenden Zelle erfolgt ja eine dauernde Einlagerung (Intussuszeption) von Zellwandteilchen. Die Stellen der bevorzugten Einlagerung werden durch die Membran-Maxima bezeichnet. Diese Stellen müssen also besonders intensiv wachsen. Im Gegensatz dazu sind es beim Gummitier gerade die dünnen Wandstellen, die der Dehnung besonders unterliegen. Offenbar ist für den Vorgang der normalen Intussuszeption und flächigen Wandbildung der Turgordruck eine Voraussetzung. Fällt dieser weg, so kommt es nur mehr zu einer polsterartigen Anlagerung eines sehr dehnbaren, wenig dichten und zusammenpreßbaren Zellulosematerials.

Besonders interessant ist es, daß trotz der Hemmung der Volumszunahme in einer Zuckerlösung die Produktion an Zellulosematerial weitergeht und sich entsprechend einem stadienabhängigen Muster symmetrisch angeordnete zentripetale Wandverdickungen bilden. Diese Tatsache zeigt, daß mit der Hemmung der osmotischen Wasseraufnahme keine Beeinflussung der Zellulose-Produktion verbunden ist. Daß auch andere Stoffwechselvorgänge durch eine osmotische Hemmung der Wasseraufnahme keine Änderung erfahren, konnte Thimann et al. (1950) für die Umwandlung von Fetten zu Zuckern und für den Verbrauch von Aminosäuren feststellen. Von den genannten Autoren wurde daher eine klare Unterscheidung von „osmotischer Hemmung" und „Stoffwechsel-Hemmung" getroffen.

Was bedeutet nun das Anlagerungsmuster für die normale, turgeszente Zelle? Es bedeutet, daß in der turgeszenten Zelle die Anlagerungs-Intensität oder die Konzentration der Membranteilchen entlang der Plasma-Oberfläche verschieden ist.

Einen ähnlichen Konzentrationsunterschied hat bereits Teiling (1950) angenommen. Er folgerte ein verstärktes Wachstum der Membran an gewissen Stellen und glaubte eine höhere Konzentration eines „meristematischen Plasmas" an diesen Stellen annehmen zu dürfen. Seine weitere Annahme, daß das peripherst gelegene Plasma das formgebende Agens ist, findet durch unsere Beobachtung eine Bestätigung, daß nach Plasmolyse kein Anlagerungsmuster mehr gebildet wird. Die Plasmolyse bewirkt ja vor allem eine Schädigung des peripherstен, der Membran anhaftenden Plasmas.

Das Kernproblem der Formbildung von *Micrasterias* stellt sich nun in der Frage nach der Ursache der lokalen Verschiedenheiten in der Membranteilchen-Konzentration. Während Teiling (1950), wie schon erwähnt, eine verschiedene Konzentration eines „meristematischen Plasmas" annimmt, stellt Waris (1950 b, vgl. auch Kallio 1951) die Hypothese eines „cytoplasmic framework" auf, das durch seine Achsen die Zellsymmetrie und damit die Lage der „Wachstumszentren" bestimmen soll. Beide Auffassungen nehmen also lokale Verschiedenheiten in der Plasmastruktur an. Das Problem wird aber auf diese Weise nicht gelöst, sondern nur verschoben, denn die Frage nach der Ursache lokaler Verschiedenheiten bleibt ja bestehen.

Die Untersuchungen von Waris (1950b, 1951), Kallio (1951) sowie Waris und Kallio (1957) haben gezeigt, daß die grobe Differenzierungsfähigkeit, die eine Symmetrie oder Assymetrie unterscheiden läßt, auch an kernlosen Zellen beobachtbar ist. So kann z. B. noch von einer kernlosen Zelle mit einseitiger „Defekt-Mutation" eine neue Halbzelle gebildet werden, welche ebenfalls nur eine Seite ausgebildet hat. Danach wird also die Zellsymmetrie von Elementen des Plasmas bestimmt und auch im Sinne einer plasmatischen Vererbung auf die Tochterzelle übertragen. Der Kern hat nach dieser Auffassung nur kontrollierende Funktionen auszuüben und ist für die feinere Formdifferenzierung unbedingt notwendig. Nach Waris (1951) wird auf die kernlose Zelle durch verschiedene Stoffe, besonders durch Desoxyribonucleinsäure (DNS), eine „formative" Wirkung ausgeübt, so daß vielleicht dem Kern die Aufgabe der Absonderung „formativer" Stoffe zukommt. Bekanntlich hat Hämmerling (1934) bei *Acetabularia* eine kernabhängige Bildung formativ wirkender Stoffe nachgewiesen.

Wardlaw (1952) und Bünning (1953) haben für die Musterbildung am Vegetationskegel höherer Pflanzen hypothetisch einen „Sperreffekt" embryonaler Anlagen angenommen. Dieser Annahme zufolge sollen stark wachsende Zonen ein Hemmfeld um sich herum ausbilden, wodurch eine Wachstumszone immer erst in einer bestimmten Entfernung von der anderen entstehen kann. Ob eine solche Vorstellung, daß stärker wachsende Bereiche einen Hemmeffekt auf benachbarte Zonen ausüben, auch auf die Einzelzelle ausgedehnt werden kann, muß völlig offen bleiben. Unsere Befunde, daß ein höher differenziertes Muster immer nur aus einem einfacheren entstehen kann, spräche eventuell für eine derartige Vorstellung. Der auf die Formbildungsprozesse am Vegetationskegel höherer Pflanzen stark wirksame Stoff 2,3,5-Trijodbenzoesäure zeigte dagegen bei *Micrasterias* keine spezifischen formativen Wirkungen, sondern wirkte nekrotisch.

Betrachtet man das Plasma gegenüber den oben gegebenen Auffassungen als dynamisches System (vgl. Abschnitt III, 4f.), das zur Ausbildung von Wellen- und Interferenzerscheinungen befähigt ist, so darf auch die Möglichkeit nicht völlig ausgeschlossen werden, daß eventuell Schwingungsvorgänge, insbesondere „stehende Wellen" mit der Ausbildung des ungemein harmonisch verlaufenden Anlagerungsmusters (vgl. z. B. Abb. 28) in Zusammenhang stehen könnten[5]. Kamiya (1953, 1959) hat die Strömungs-

[5] Stehende Wellen kommen dadurch zustande, daß zwei mit gleicher Geschwindigkeit fortschreitende Wellen gegeneinander laufen und sich überlagern. Das bekannteste Beispiel sind die „Chladnischen Klangfiguren", die entstehen, wenn Sand auf tönende Metallplatten gestreut wird. Von den schwingenden „Wellenbäuchen" werden die Sandkörnchen weggeschleudert und sammeln sich an den ruhenden Knotenlinien nach einem bestimmten Muster an.

Viel feiner differenzierte Muster von stehenden Wellen hat Bergmann (1948, 1959) an schwingenden Glaskörpern nachgewiesen, wobei die stehenden, elastischen Schwingungen im Glas Spannungen erzeugen, die im polarisierten Licht sichtbar gemacht werden können. Die von Bergmann erhaltenen Schwingungsmuster erinnern oft in erstaunlicher Weise an die Schalenstrukturen gewisser zentrischer Diatomeen. Das Aussehen dieser Muster erscheint wesentlich abhängig von der Anregungsfrequenz.

kraft-Kurven von Myxomyceten nach der Fourier-Analyse zerlegt und damit „interplasmatische Interferenz" nachgewiesen. Im Characeen-Plasma lassen sich schraubig ablaufende Transversalwellen an den Chloroplastenketten beobachten und photographieren (Jarosch 1960), die mit der Plasmaströmung die ganze Zelle durchmessen. An den Fibrillenringen des ausgepreßten Characeen-Plasmas laufen gleichbleibende polygonale Gestalten (!) wellenförmig herum. Durch die Annahme „stehender Wellen" ließe sich trotz der inneren Dynamik des Protoplasmas (starken Plasmaströmung) das längere Bestehen eines Anlagerungsmusters verstehen. In grober Analogie zu den Chladnischen Klangfiguren könnte die Membransubstanz entlang der submikroskopisch schwingenden Plasmaoberfläche verteilt angenommen werden.

Es sei noch darauf hingewiesen, daß mit dem Verlust der Formdifferenzierungsfähigkeit bei Beleuchtung, mit einer verstärkten Plasmaströmung auch eine verminderte Anlagerung von Membransubstanz verbunden ist. Dies kann aber keinesfalls im Sinne der Beziehung: wenn Strömung, dann Unfähigkeit zur Membranbildung verallgemeinert werden, weil bekanntlich die Membranen vieler Pflanzen (z. B. der Characeen) auch bei intensiver Plasmaströmung wachsen. Nach Waris (1951) können auch kernlose *Micrasterias*-Zellen, die eine heftige Strömung erkennen lassen, noch eine wenig differenzierte Membran aufbauen.

Zusammenfassung

Die wichtigsten Ergebnisse dieser Arbeit können wie folgt zusammengefaßt werden:

Die Phasen der Formentstehung von *Micrasterias rotata* wurden im Abstand von 15 Min. photographiert und die Veränderungen genau beschrieben. Die Formbildung vollzieht sich an der zarten „Bildungsmembran", die von der groben, erst an der fertigen Gestalt entstehenden „Dauermembran" zu unterscheiden ist. Dabei werden die einzelnen Lappen durch Einschnürungen voneinander getrennt. Die zahlenmäßige Bezeichnung der Einschnürungen in der Reihenfolge ihrer Entstehung führt zu einer einfachen Lappen-Nomenklatur.

Die beiden entstehenden Tochterzellen sind von einem mit Neutralrot nachweisbaren „Gallertnetz" umhüllt.

Die Ansammlungen der Golgikörper sind die Stellen der Vakuolenentstehung. Die Vakuolen entstehen neben den Golgikörpern.

Vor und während der Formbildung zeigt das Protoplasma eine als „wogende Agitation" beschriebene Bewegung. Vor dem Beginn der Formdifferenzierung wird diese Bewegung für kurze Zeit durch eine ringförmig verlaufende Strömung verdrängt. Auch am Ende der Formdifferenzierung setzt heftige Strömung ein. Dauernd beleuchtete Zellen zeigen lebhafte Plasmaströmung schon in frühen Entwicklungsstadien und verlieren die Fähigkeit zur weiteren Formbildung.

Teilungsstadien, bei denen der Turgordruck durch Einbringen in 0,2 mol Traubenzucker aufgehoben wurde, können ihr Volumen nicht mehr vergrößern und lagern die Bildungsmembran verdickt an. Die Intensität dieser

Anlagerung erfolgt nach einem bestimmten Muster, das Anlagerungsmaxima und -minima erkennen läßt. Die Differenzierung der Seitenlappen im Verlauf der Formbildung beruht auf einer Spaltung der Membranminima. In einem gehemmten Seitenlappen wurde niemals ein differenziertes Muster beobachtet, als seinem durch die Kontur bestimmten Entwicklungszustand entspricht.

Teilungsstadien, die in 0,10 bis 0,15 mol Traubenzucker gebracht werden, zeigen nur lokale Volumszunahmen der Lappen. Die nicht vergrößerten Lappenteile lassen wie in 0,2 mol TRZ Verdickungen der Bildungsmembran erkennen. Wird der Turgordruck nur für kurze Zeit (etwa 1 Stunde) durch Einlegen in 0,2 mol TRZ aufgehoben, so entstehen dreidimensionale Verdoppelungen der Seitenlappen, wie sie von diploiden Zellen bekannt sind.

$Indol_3$-essigsäure und Trijodbenzoesäure zeigen keinen spezifisch „formverändernden" oder wachstumsfördernden Einfluß auf die Zelle, sondern bewirken anscheinend nur Allgemeinschädigung.

Verschiedene andere Außenfaktoren, wie Kälteeinwirkung, Vibration, dauernde mäßige Beleuchtung, bewirken starke Störungen in der Formbildung. Die mögliche Bedeutung dieser Faktoren als Ursache für die in der Natur auftretenden Formveränderungen wird besprochen.

Die Funktionen von Turgordruck und Membran-Anlagerungsmuster im Rahmen der Formbildung werden diskutiert und zur Erklärung des Anlagerungsmusters verschiedene Möglichkeiten erörtert.

Unserem gemeinsamen Lehrer, Prof. Dr. K. Höfler, möchten wir an dieser Stelle unseren ergebenen Dank aussprechen.

Literatur

Åkerman, Å., 1917: Untersuchungen über die Aggregation in den Tentakeln von *Drosera rotundifolia*. Bot. Notiser 145.

Bancher, E., und K. Höfler, 1959: Protoplasma und Zelle, in: Grundlagen der allgemeinen Vitalchemie, Herausgeb. H. Linser. Urban & Schwarzenberg, Wien-Innsbruck.

Bergmann, L., 1949: Eigenschwingungen von Glaszylindern. Z. Physik *125*, 405—417.

— 1958: Eigenschwingungen von Glasringen. Z. Physik *151*, 46—53.

Bünning, E., 1953: Entwicklungs- und Bewegungsphysiologie der Pflanze. Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 3. Aufl.

Chardard, R., et C. Rouiller, 1957: L'ultrastructure de trois algues Desmidiées. Étude au microscope électronique. Rev. Cytol. et Biol. végét. *18*, 153.

Cholnoky, B. von, und K. Höfler, 1950: Vergleichende Vitalfärbeversuche an Hochmooralgen. S. B. Wien. Akad. Wiss., math.-nat. Kl., Abt. I, *159*, 143.

Czurda, V., 1935: Über die Begriffe „Typus" und „Variabilität" in der Systematik der Algen. Beih. Bot. Zbl. *53*, 158—171.

Drawert, H., und I. Metzner-Küster, 1961: Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an Desmidiaceen. I. Mitteilung. Planta *56*, 213—228.

Drawert, H., und M. Mix, 1961 a: Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an Desmidiaceen. II. Mitteilung. Planta *56*, 237—261.

Drawert, H., und M. Mix, 1961 b: Licht und elektronenmikroskopische Untersuchungen an Desmidiaceen. V. Mitteilung, Planta *56*, 648—665.

Dick, J., 1919: Beiträge zur Kenntnis der Demidiaceen-Flora von Südbayern. Kryptogamenforschungen, Bayer. Bot. Ges. *IV*.
— 1926: Beiträge zur Desmidiaceenflora von Südbayern. III. Kryptog. Forsch. *I*, 7.
Ducellier, F., 1915: Contribution à l'étude du polymorphisme et des monstruosités chez les Desmidiées I. Bull. Soc. Bot. Genève, sér. 2, *VII*, 75—118.
— 1918: Contribution à l'étude de la flore desmidiologique de la Suisse II. Bull. Soc. Bot. Genève, sér. 2, *II*.
Eibl, K., 1938: Kontraktion der Chromatophoren bei *Micrasterias rotata*. Protoplasma *32*, 215.
Focke, G. W., 1847: Physiologische Studien, Bremen.
Friedmann, H., 1949: Wissenschaft und Symbol. Biederstein-Verlag, München.
Gistl, R., 1914: Beiträge zur Kenntnis der Desmidiaceenflora der bayerischen Hochmoore. Phil. Diss., München.
Gorter, C. J., 1949: Action of 2, 3, 5-triiodobenzoic acid on the growth of root-hairs. Nature *164*, 800—801.
Hämmerling, J., 1934: Über formbildende Substanzen bei *Acetabularia mediterranea*, ihre räumliche und zeitliche Verteilung und ihre Herkunft. Arch. Entwicklungsmech. der Organismen *131*, 1—81.
Hauptfleisch, P., 1888: Zellmembran und Hüllgallerte der Desmidiaceen. Mitt. natw. Ver. Neuvorpomm. u. Rügen *20*, 1.
Heimans, J., 1942: Triquetrous forms in the genus *Micrasterias*. Blumea, Suppl. *II*, 52—63.
Hirn, I., 1953: Vitalfärbestudien an Desmidiaceen. Flora *140*, 453—473.
Höfler, K., und H. Schindler, 1952: Algengallerten im Vitalfärbeversuch. Österr. bot. Zschr. *99*, 529—535.
Homfeld, H., 1929: Beitrag zur Kenntnis der Desmidiaceen Nordwestdeutschlands. Pflanzenforschung *12*, 1—96.
Jarosch, R., 1960: Die Dynamik im Characeen-Protoplasma. Phyton (Buenos Aires) *15* (*1*), 43—66.
— 1961: Das Characeen-Protoplasma und seine Inhaltskörper. Protoplasma *53*, 34—56.
Kallio, P., 1949: Artificially produced binuclear, diploid and anuclear desmids. Arch. Soc. Vanamo *2*, 42—44.
— 1951: The significance of nuclear quantity in the genus *Micrasterias*. Ann. Botan. Soc. Zool. Botan. Fennicae Vanamo *24*, 1—122.
— 1953: The effect of continued illumination on the desmids. Arch. Soc. Bot. Fennicae Vanamo *8*, 58—74.
— 1954: Arch. Soc. Vanamo *8*, 118—122.
— 1957: Arch. Soc. Vanamo *11*, 193—204.
Kamiya, N., 1953: The motive force responsible for protoplasmic streaming in the myxomycete plasmodium. Ann. Rep. Sci. Works Osaka University *1*, 53.
– 1959: Protoplasmic streaming, in: Protoplasmatologia, Handb. der Protoplasmaforschg. Herausgeb. L. V. Heilbrunn und F. Weber. Wien, Springer-Verlag.
Kiermayer, O., 1954: Die Vakuolen der Desmidiaceen, ihr Verhalten bei Vitalfärbe- und Zentrifugierungsversuchen. S. B. Wien. Akad. Wiss., math.-nat. Kl., Abt. I, *162*, 175—222.
— 1955: Über die Reduktion basischer Vitalfarbstoffe in pflanzlichen Vakuolen. S. B. Wien. Akad. Wiss., math.-nat. Kl., Abt. I, *164*, 275—302.
— 1961: Über die formative Wirksamkeit der 2, 3, 5 — Trijodbenzoesäure (TIBA) im vegetativen und generativen Bereich von *Solanum nigrum*. Österr. bot. Z. *108*, 101—156.

Kiermayer, O., und R. Jarosch, 1961: Vorkommen von *Pleurenterium tumidum* in einem Mühlviertler Hochmoor. Verh. Zool. Bot. Ges. *100*, 198—199.

Kinzel, H., 1953: Untersuchungen über die Chemie und Physikochemie der Gallertbildungen von Süßwasseralgen. Österr. bot. Z. *100*, 25.

— 1959: Plasmaeinschlüsse bei den Zygnemataceen. Protoplasma *50*, 498—500.

Kopetzky-Rechtperg, O., 1932: Die Nukleolen im Kern der Desmidiaceen. Beih. Bot. Cbl. *49*, Abt. II, 686—702.

Kramer, G., 1960: Plasmaeinschlüsse bei einigen Desmidiaceen-Gattungen. Protoplasma *52*, 184—211.

Krebs, I., 1951: Beiträge zur Kenntnis des Desmidiaceen-Protoplasten. S. B. Wien. Akad. Wiss., math.-naturw. Kl., Abt. I, *160*, 579—613.

Krieger, W., 1937: Die Desmidiaceen, in: Rabenhorsts Kryptogamenflora, *13*, 2. Aufl.

Laporte, L. J., 1951: Recherches sur la Biologie et la Systématique des Desmidiées. Thèse, Paris.

Lefèvre, M., 1939: Recherches expérimentales, sur le Polymorphisme et la Tetratologie des Desmidiées. Encyclopedie Biol. *19*, 1—43.

Lütkemüller, J., 1902: Die Zellmembran der Desmidiaceen. Beitr. Biol. Pflanz. *8*, 347.

Nägeli, C., 1855: Pflanzenphysiologische Untersuchungen *I*, Zürich.

Perner, S., 1958: Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Cytomorphologie des sogenannten „Golgisystems" in Wurzelhaaren verschiedener Angiospermen. Protoplasma *49*, 407.

Pringsheim, E. G., 1930: Die Kultur von *Micrasterias* und *Volvox*. Arch. Protistenkde. *72*, 1—47.

Pringsheim, N., 1881: Über Lichtwirkung und Chlorophyllfunktion in der Pflanze. Jb. wiss. Bot. *12*, 288—437.

Schulz, P., 1930: Zur Zygosporenbildung zweier Desmidiaceen. Ber. Westpreuß. Bot. Zool. Ver. *52*.

Seifritz, W., 1943: Protoplasmatic streaming. Bot. Rev. *9*, 49—123.

Sitte, P., 1958: Die Ultrastruktur von Wurzelmeristemzellen der Erbse. Protoplasma *49*, 447—522.

Teiling, E., 1950: Radiation of Desmids, its origin and its consequences as regards taxonomy and nomenclature. Bot. Notiser, 299—327.

Thimann, K. V., R. R. Slater and G. S. Christiansen, 1950: The metabolism of stem tissue during growth and its inhibition. IV. Growth inhibition without enzyme poisoning. Arch. Biochem. *28*, 130—137.

Wardlaw, C. W., 1952: Morphogenesis in plants. Methuen & Co., London.

Waris, H., 1926: Nahrungsphysiologische Versuche an *Micrasterias rotata*. Comm. Biol. Soc. Scient. Fenn. *II*, 8, 1—42.

— 1933: Über die Rolle des Calciums im Leben der Zelle auf Grund von Versuchen an *Micrasterias*. Planta *19*, 1—45.

— 1939. Über den Antagonismus von Wasserstoffionen und Metallkationen bei *Micrasterias*. Acta Bot. Fenn. *24*, 1—36.

— 1950 a: Cytophysiological Studies on *Micrasterias* I. Nuclear and cell division. Physiol. Plantarum *3*, 1—16.

— 1950 b: Cytophysiological Studies on *Micrasterias* II. The cytoplasmatic framework and its mutation. Physiol. Plantarum *3*, 236—245.

— 1951: Cytophysiological Studies on *Micrasterias* III. Physiol. Plantarum *4*, 387—409.

Waris, H., 1956: Cytophysiological Studies on *Micrasterias*. IV. Effects of acids upon the nuclear aspect and the resistance of the cell. Physiol. Plantarum *9*, 82—101.

— 1858: Splitting of the nucleus by centrifuging in *Micrasterias*. Ann. Acad. Sci. Fennicae, Ser. A IV, *40*, 1—12.

— and P. Kallio, 1957: Morphogenetic effects of chemical agents and nucleocytoplasmic relations in *Micrasterias*. Ann. Acad. Sci. Fennicae, Ser. A IV, *37*, 1—16.

West, W., and G. S. West, 1905: A Monograph of the British Desmidiaceae. Vol. *II*, London.

Wrischer, M., 1961: Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Golgikörpern pflanzlicher Zellen nach Fixierung mit Kaliumpermanganat. Mikroskopie *15*, 289—294.

Anschrift der Verfasser: Dr. Oswald Kiermayer: Institut für Entwicklungsphysiologie der Universität Köln, Gyrhofstraße 17. Dr. Robert Jarosch: Mikrobiologische Station der Stadt Linz, Linz a. d. Donau, Roseggerstraße 22.

Electron Microscopy of the Slime Mold *Physarum polycephalum*

By

D. J. Dugas, M. S., and **Jean D. Bath**, Ph. D.

Department of Biophysics and Nuclear Medicine, School of Medicine, University of California, Los Angeles

With 5 Text Figures

(Received June 1, 1961)

Introduction

Importance of Physarum

The slime mold, *Physarum polycephalum*, a classic protoplasmic material in its plasmodial stage has been reported many times as a test object for a variety of experimental work. Since it was first described, it has been a favorite subject for the observation of protoplasmic movement and studies on the physical properties of protoplasm (Kamiya 1959, Seifriz 1942). The organism has shown considerable versatility, serving as a test material for investigations of radiation effects (Gray 1941, Seifriz 1936, Warren and Scott 1943), the action of anesthetics (Seifriz 1950), diffusion rates in living protoplasm (Smith and Labaw 1948), metabolic activity (Ohta 1954), pinocytotic mechanisms (Guttes and Guttes 1960), and the relation of DNA synthesis to the mitotic cycle (Nygaard, Guttes and Rusch 1960).

This diversity of uses is due to several unique properties of *Physarum*: (a) It is not cellular in the vegetative phase, but forms a multinucleate plasmodium. (b) This naked plasmodium is capable of moving freely about in search of nutrient. (c) The protoplasm within the plasmodial network maintains a rhythmic streaming. (d) Division of nuclei throughout a plasmodium occurs almost simultaneously. (e) The plasmodium contains a pigment which changes color with variations in hydrogen ion concentration.

Description of the organism

Howard (1931, 1932) has described in detail the life history of *Physarum polycephalum*. It usually exists as a multinucleate plasmodium, but when nutrients become scarce, it separates into stalked sporangia, each con-

taining several nuclei. The mature capsules liberate uninucleate spores which, under proper conditions, form flagellates that multiply by binary fission and develop into myxamoebae. The free-living myxamoebae eventually coalesce to form a continuous plasmodium again. Under adverse conditions, particularly dehydration, the organism can also form a hard sclerotium and remain dormant until the situation becomes favorable once more. The nuclei then tend to clump together into larger or smaller masses which encapsulate and desiccate (Cowdry 1918).

The normal plasmodium is a bright yellow. The pigment largely responsible for this color is capable of acting as a vital indicator, since it changes color in response to changes in hydrogen ion concentration (Seifriz and Zetzman 1935), varying from green-yellow at pH 7.5 to orange-yellow at pH 3.5.

The *Physarum* plasmodium resembles the amoebae in many ways, particularly in its mode of locomotion. It travels by the extension of pseudopodia from an outer hyaline region and the subsequent flow of protoplasm into the advancing front. The flow of solated material does not occur uniformly throughout the organism but is confined to channels in the inner regions of the plasmodium, which are bounded by areas of similar material in the gel state. These channels are flexible and subject to change as the sol-gel relationship changes. The direction of streaming is not constant but is rhythmically reversed, forward then back, with a net gain in the direction of advancement (Camp 1937). It is interesting to note that fluctuations in electrical potential and impedance of the protoplasm correlate closely with the rhythmic reversal in flow (Iwamura 1952, Kishimoto 1958).

Since the vegetative *Physarum* is acellular, it does not expand in size by the ordinary process of duplication. Nuclei increase in number by dividing within the protoplasmic mass. Those throughout a single plasmodium divide almost simultaneously, although there is no apparent diurnal periodicity governing the time of the event (Howard 1931, 1932). Cytological observations show that each division follows a typical mitotic pattern, but occurs within the nucleus; that is, the nuclear membrane remains intact throughout the process until the daughter nuclei separate (Howard 1931, 1932).

In spite of the value of *Physarum polycephalum* as a laboratory test material, very little information has appeared concerning its submicroscopic structure. Far more is known about the details of a related organism, *Dictyostelium discoideum*, also a favorite in experimental studies. Bonner (1959), in his review of the cellular slime mold, summarizes the collected data on *Dictyostelium* and includes electron micrographs showing its fine structure. Knowledge of this organism has been extended by other electron microscopic investigations (Gezelius and Ranby 1957, Mühlethaler 1956).

The electron microscope studies of Sponsler and Bath (1953, 1954) revealed a variety of structures in plasmodial suspensions of *Physarum*. Notable among these were round, chambered bodies, particles containing

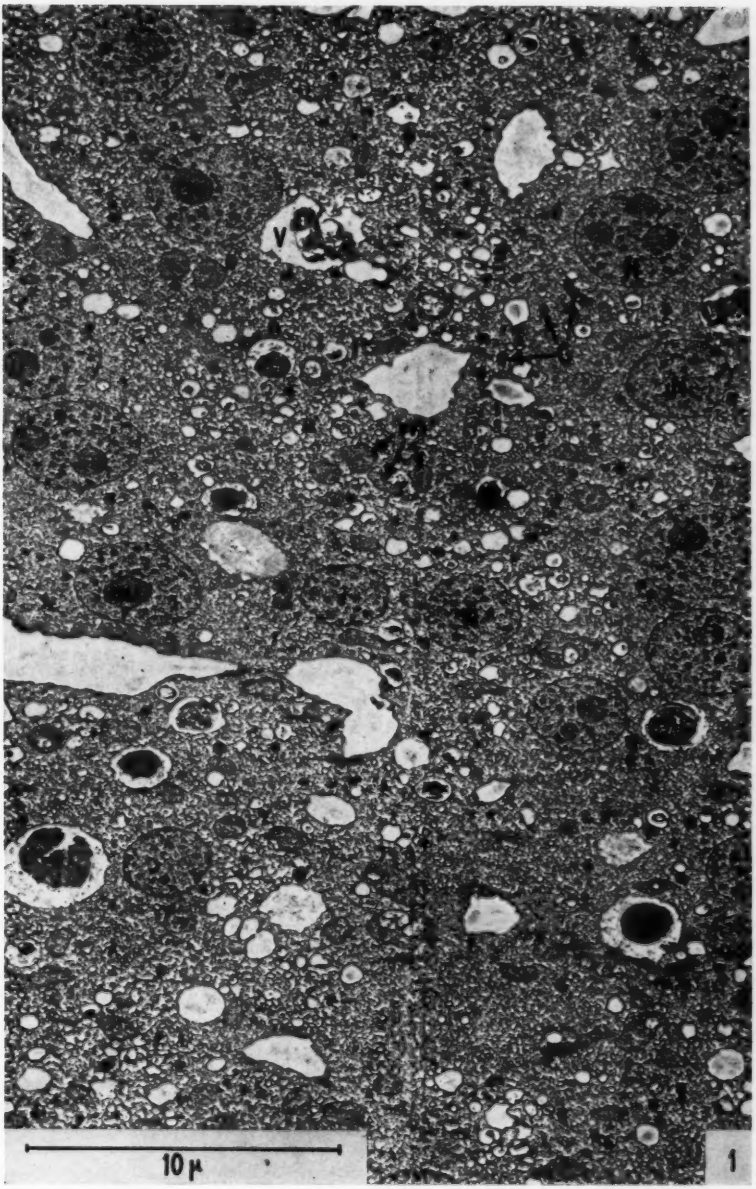


Fig. 1. Electron micrograph of a section of *Physarum polycephalum*, fixed in osmic acid. Examples of the major structures are labeled as follows: Nuclei (*N*), nucleoli (*nu*), mitochondria (*m*), dark granules (*G*), and vacuoles (*V*).

dense particulates in their interiors and long fibrillae 500–600 Å in diameter. Considerable interest in possible fibrous constituents of *Physarum polycephalum* has arisen since the discovery of an actomyosin-like substance in the plasmodium by Loewy (1952). On this basis "myxomyosin" has been postulated as a contractile protein involved in the dynamics of protoplasmic streaming (Loewy 1952; Ts'o, Eggman and Vinograd 1956). Subsequent electron microscope inspection of protein extracts from *Physarum polycephalum* has reported network arrangements (Kishimoto 1958) or rigid rods (Ts'o, Eggman and Vinograd 1956). However, Stewart and Stewart (1959) did not find such structures after examining fixed sections of the plasmodium and so felt the hypothesis of contractile protein fibers to be still in doubt.

In order to fully exploit the unique advantages of *Physarum polycephalum* as a test object, it seems pertinent at this time to probe deeper into the lower levels of its organization (Terada 1958). Therefore, this electron microscope study has been undertaken with the purpose of displaying further in fixed sections some of the structural element which thus far have remained unexplored. Such studies should assist also in the identification of submicroscopic particulates which have been observed in plasmodial suspensions of the same material (Bath unpublished, Sponsler and Bath 1954).

Material and Method

Plasmodia of *Physarum polycephalum* were grown in test tubes containing slants of agar sprinkled with oatmeal. They were maintained at room temperature in a darkened room and transferred to fresh substrate as nutrients were consumed. Portions of rapidly-growing plasmodia, collected approximately three days after transplanting, were removed from the stock culture, cut into 0.5 cubic millimeter bits and placed in a 1% osmium-tetroxide fixing solution modified slightly from Palade's (1952). It consisted of:

0.5 g vial of osmium tetroxide,
17.0 ml water,
10.0 ml veronal buffer,
3.6 ml NaCl solution (8.5%),
10.0 ml (approx.) 0.1 N HCL to bring pH to 7.2–7.4,
9.4 ml (approx.) distilled water to bring total to 50 ml.

After ½ hour fixation the specimens were placed in a buffer solution for 5 minutes and then in a series of successively more concentrated alcohols for 2 hours. Embedding was accomplished in gelatin capsules using a mixture of butyl- and methyl-methacrylates catalysed with benzoyl peroxide. The capsules were polymerized under ultraviolet light for 24 hours and cured at room temperature for 3–4 weeks. A Porter-Blum ultramicrotome[1] was employed to cut sections approximately 500 Å in thickness. These were mounted on 200-mesh copper screens which had previously been coated with parlodion plus an evaporated film of car-

[1] This equipment was made available in the Electron Microscope Laboratory of Mr. Francis Bishop, Laboratory of Nuclear Medicine and Radiation Biology. Technical assistance was provided by Mrs. Ruth G. McCandless of that laboratory.

bon. The methacrylate was not removed from the sectioned material prior to electron microscope examination. All observations were made with an RCA EMU-2 instrument [2].

Results

The following micrographs show typical structures of *Physarum polycephalum* as observed with the electron microscope. Fig. 1, taken at low magnification, illustrates the arrangement of nuclei, mitochondria, vacuoles etc. as they appear in sectioned plasmodia.

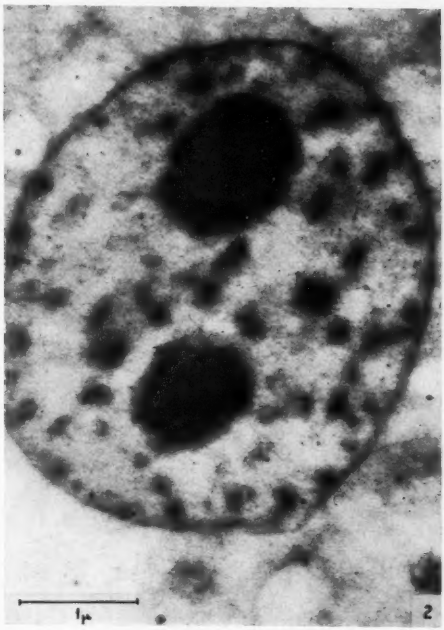


Fig. 2. Enlarged view of a single nucleus showing membrane, two prominent nucleoli, and clumped chromatin. Dark twisted structures are evident within the nucleoli.

Nuclei were quite numerous and randomly distributed throughout the protoplasm. They averaged 4 microns in diameter. They contained as many as four nucleoli, although there were usually one to three. The nucleoli varied greatly in size, ranging up to 1.75 microns in diameter when they appeared singly, and correspondingly less when there were several in one nucleus, sometimes being as small as 0.6 microns in diameter. Fine structure within the nucleolar mass could often be detected in the form of

[2] The R. C. A. EMU-2, maintained by Mr. Edward Bowler, was made available by the College of Engineering.

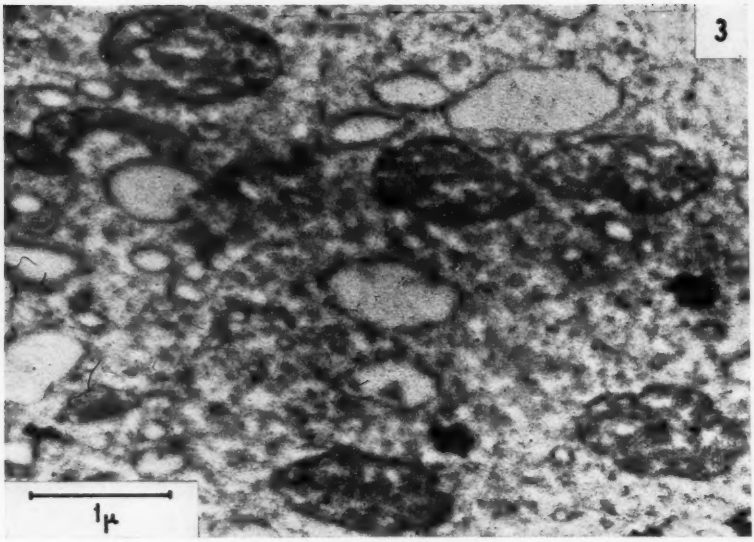


Fig. 3. Several mitochondria exhibiting vesiculated structure.

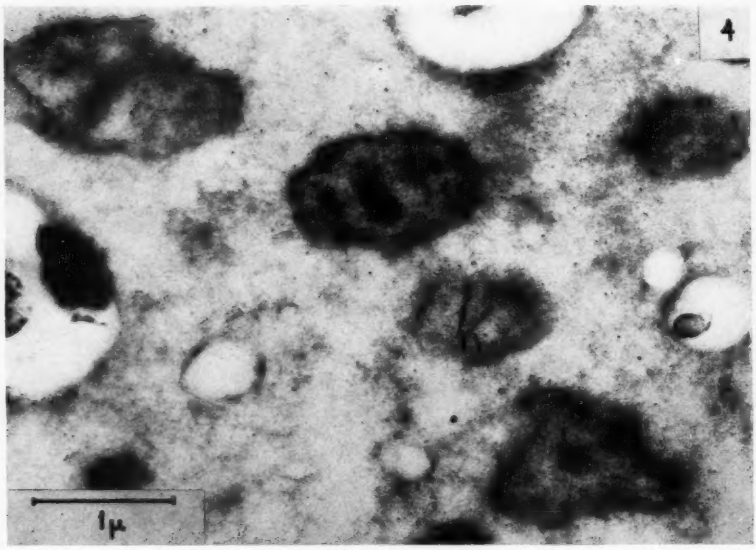


Fig. 4. Illustration of the rod-shaped elements within irregular bodies.

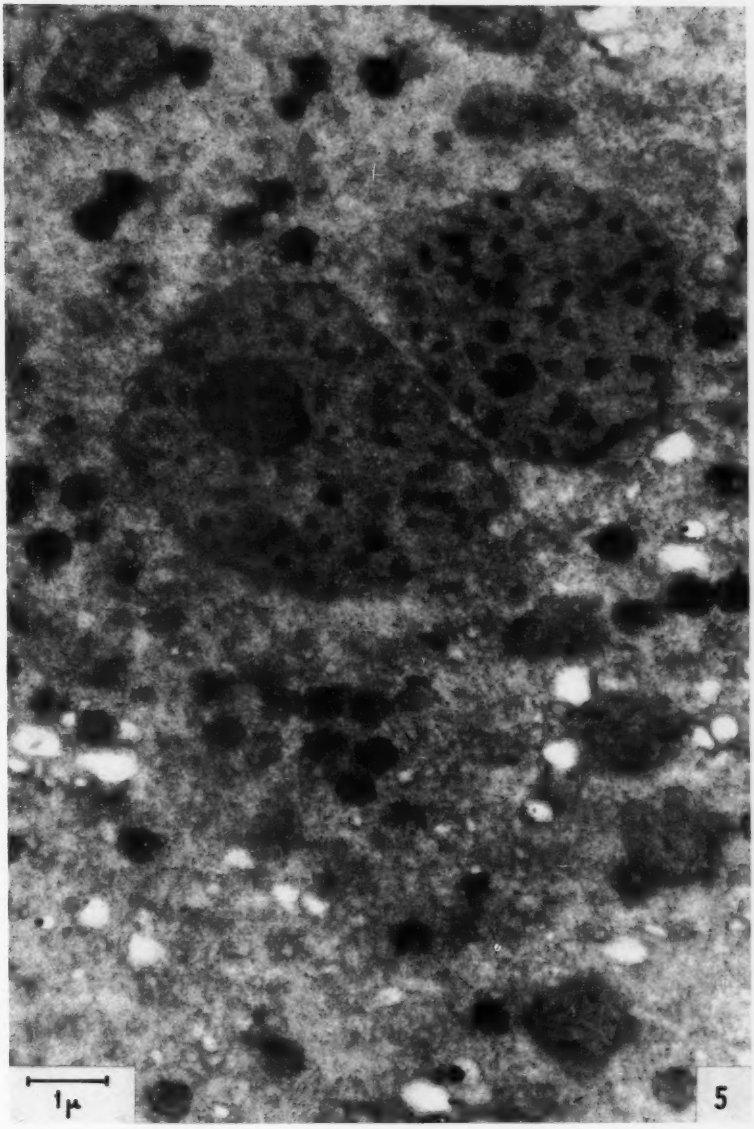


Fig. 5. Two nuclei in close proximity, with clusters of dark-centered, angular granules nearby. Several rod-containing bodies can also be seen.

a dark, twisted substance at the periphery as in Fig. 2. Clumps of chromatin are scattered about the nucleoplasm with no apparent organization. The entire nucleus is enclosed by a membrane 300–400 Å which in favorable sections can be seen to be double.

Cytoplasmic components can be roughly classified into three groups. First, there are irregular, membrane-limited bodies of the order of 1–1.5 microns across. At sufficient magnification there is visible in them a vesiculation characteristic of protozoan mitochondria (see Fig. 3).

Additional bodies of similar size and shape, but lacking the inner cristae, were also much in evidence. They had a rather dark background substance which often had a more opaque patch near the center. These bodies are especially interesting because of the rod-shaped particles present in them (see Fig. 4). These rods have dimensions in the macromolecular region, averaging 260 Å in diameter with lengths varying from 1000 Å to 4500 Å. They appear very dark, indicating a high density and/or great affinity for osmic acid. In low power micrographs, the rod-containing bodies were difficult to distinguish from mitochondria, and structures could often be observed which seemed to have some of the characteristics of both. The rod-containing particles are being investigated further in plasmodial suspensions (Bath unpublished).

The third type of cytoplasmic particle appears as small black dots in Fig. 1. Closer inspection showed them to be decidedly angular in shape with a dense central region and a sharply defined outer boundary (Fig. 5). These granules are quite uniform in size, measuring about 0.5 microns across.

Vacuoles were present throughout the sectioned material, some empty and others containing foreign inclusions. Some of the clear globular-type structures may correspond to the orange-yellow pigmented globules described by Chambers (1943). The large irregular open spaces seen frequently in the micrographs are probably due to the anastomosing character of the plasmodium. The matrix itself, in fixed and sectioned material, shows no positive indication of a structural framework or fibrillar component, although such material is sometimes observed in plasmodial suspensions.

Discussion

Discussion of Methods

Although the methods of fixation and sectioning used here are quite commonly employed for electron microscope studies of tissues, there are still many limiting factors that are apt to distort results if conclusions are drawn without careful consideration. Osmic acid, one of the most satisfactory fiixatives and electron stains, deposits its heavy atoms in the tissue when it reacts at the double bond of unsaturated fats, vitamins etc. In this manner it tends to increase the electron scattering ability of the reactive constituents and make them more prominent in subsequent micrographs (Bahr 1954, Danielli 1953). However, Ornstein (1957) is of the opinion that any added amount of contrast could not be significant in

comparison to the inherent mass density of cell structures and that "osmiophilia" is a misleading term in descriptions of fixed material. According to his hypothesis the areas rich in nucleic acids would appear most dense, the proteins somewhat less dense, and the lipids much lighter. (This hypothesis is also the one on which earlier electron microscope interpretation by Sponsler and Bath have been based.) Since the fundamental organic constituents seldom occur naturally in uncomined forms, the theoretical considerations still do not completely relieve the ambiguity of electron micrograph interpretations in terms of photographic density. Added to this is the destructive action of the fixing and dehydrating solutions which may shrink the tissues an unknown amount and tend to collapse delicate structures and possibly shift them from their original positions. With these factors in mind one may venture some tentative interpretations of the structures observed in *Physarum.*

Discussion of Observations

Most of the structures observed in *Physarum* exhibited the patterns of typical cellular constituents, although a few had properties peculiar to this organism. Similarities to the submicroscopic morphology of the amoebae are especially noteworthy (Pappas 1959).

The nuclei observed in the present study were esentially the same form as those seen in many cellular organisms. They were not observed during a division cycle, and therefore the structure of chromosomes or chromosome-like structures and mitotic mechanisms are not included. Previous estimates as to the size of the nuclei in *Physarum* are not in good agreement. Howard (1932), using light microscopy, reported diameters of 2.5 to 3.5 microns, while Andresen and Pollock (1952) record 4–7 microns. These differences could be at least partially due to the conditions of hydration and fixation under which they were studied. The average diameter observed in this work was 4 microns, which falls midway between the previously reported ranges and is in agreement with the work of Stewart and Stewart (1959).

Mitochondria observed in normal *Physarum* resemble those of most protozoans and simple organisms. That is, they have a double membrane with inward fingerlike protrusions, instead of the laminar cristae characteristic of mammalian mitochondria (Brandt and Pappas 1959, Sedar and Rudzinska 1956).

The rod-containing bodies offer a more perplexing problem, for they do not correspond to any of the ordinary classifications of cellular constituents. Placing them in a category distinct from mitochondria may be erroneous, as they resemble the latter in many respects. Rouiller and Bernhard (1956) in their studies of liver cells found somewhat similar bodies in association with mitochondria and designated them as "microbodies." These bodies had a single membrane and a dense granular matrix with a more opaque and homogeneous core. During liver regeneration, the mitochondria degenerated, while the microbodies become more numerous, larger, and assumed various forms, some having properties inter-

mediate between mitochondria and microbodies. The authors then postulated that the microbodies were precursors to mitochondria. It is conceivable that a similar situation exists with *Physarum*, since it also exhibited two types of bodies which were often indistinguishable, and transition stages could be tentatively identified. As regards size, they both were found in such a wide range of dimensions that it would be difficult to determine on that basis alone if one type of body were simply a developmental stage of the other. Certainly a great deal more evidence would be required to attach any confidence to such a suggestion. Brandt and Pappas (1959) have postulated a nuclear origin for mitochondria in the Amoeba, *Pelomyxa carolinensis*. Their electron micrographs showed that the membrane of a post-division nucleus was often continuous with mitochondrial membranes. Such was not observed here with *Physarum polycephalum*, but of course it would require an extremely favorable section to view the small area of continuity, and it may occur only at some precise stage following divison. Cowdry (1918) has commented that mitochondria are often found near nuclei.

The dense angular granules seen in the cytoplasm of *Physarum* cannot be positively identified at this point. Their very dark appearance would indicate that they have a high inherent mass density as do carbohydrates and nucleic acids (Ornstein 1957). It may be then that they are either nucleic-acid containing particulates or glycogen reserve granules. It is also a possibility that they correspond to the pigmented material, which has previously been reported to be in a granular form for this species (Andresen and Pollock 1952).

Summary

Electron micrographs of fixed sections of the plasmodium of the classic protoplasmic material, *Physarum polycephalum*, are presented. Numerous round nuclei having well-defined membranes and containing one to three dense nucleoli were especially prominent in the plasmodium. In the surrounding cytoplasm, many irregular membrane-limited bodies were evident, some containing tiny rod-like elements and others with inner structures resembling mitochondria. In addition, there can be seen many small dense granules plus various vacuoles and other inclusions.

Literature

Andresen, N., and B. M. Pollock, 1952: C. r. Lab. Carlsberg (Ser. Chim.) *28*, 247.

Bahr, G. F., 1954: Exper. Cell Res. *7*, 457.

Bath, Jean D., unpublished.

Bonner, J. T.: The Cellular Slime Molds, pp. 25—54. Princeton University Press, Princeton, 1959.

Brandt, W., and G. D. Pappas, 1959: J. Biophys. Biochem. Cytol. *6*, 91.

Camp, W. G., 1937: Bull. Torrey Botan. Club *64*, 307.

Chambers, Robert, 1943: Biological Symposia *10*, 91.

Cowdry, N. H., 1918: Biol. Bull. *35*, 71.

Danielli, J. F.: Cytochemistry, p. 17. Wiley, N. Y., 1953.
Dugas, D. J., and Jean D. Bath: Unpublished work.
Gezelius, K., and B. G. Ranby, 1957: Exper. Cell Res. *12*, 265.
Gray, W. D., 1941: Am. J. Botany *28*, 215.
— 1955: Ohio J. Sci. *55*, 212.
Guttes, E., and S. Guttes, 1960: Exper. Cell Res. *20*, 239.
Howard, F. L., 1931: Am. J. Botany *18*, 116.
— 1932: Ann. Botany *46*, 461.
Iwamura, J., 1952: Cytologia *17*, 322.
Kamiya, N.: Protoplasmic Streaming. In: Protoplasmatologia 1959, *8*, 3a. Springer, Wien.
Kishimoto, U., 1958: J. Gen. Physiol. *41*, 1223.
Lewis, W.: The Structure of Protoplasm. Ed. by W. Seifriz, 1942, p. 163, Ames, Iowa.
Loewy, A. G., 1952: J. Cell Comp. Physiol. *40*, 127.
Mühlethaler, K., 1956: Am. J. Botany *43*, 673.
Nygaard, O. F., S. Guttes, and H. P. Rusch, 1960: Biochim. et Biophys. Acta *38*, 298.
Ohta, J., 1954: J. Biochem. *41*, 489.
Ornstein, L., 1957: J. Biophys. Biochem. Cytol. *3*, 809.
Palade, G., 1952: J. Exper. Med. *95*, 285.
Pappas, G. D.: Ann. N. Y. Acad. Sci., 1959, *78*, 448.
Rouiller, C., and W. Bernhard, 1956: J. Biophys. Biochem. Cytol. *2*, No. 4, pt. 2, p. 355.
Seifriz, W., and Marie Zetzman, 1935: Protoplasma *23*, 175.
— 1936: Protoplasma *25*, 196.
— (Ed.): The Structure of Protoplasm. pp. 156, 173, 199, 246. Iowa State College Press, Ames, Iowa, 1942.
— 1950: Anesthesiology *11*, 24.
Sponsler, O. L., and Jean D. Bath, 1953: Protoplasma *42*, 69.
— — 1954: Protoplasma *44*, 259.
Smith, F., and L. W. Labaw, 1948: J. Cell and Comp. Physiol. *32*, 407.
Sedar, A. W., and M. A. Rudzinska, 1956: J. Biophys. Biochem. Cytol. *2*, Suppl. No. 4, part 2, p. 331.
Stewart, P. A., and B. T. Stewart, 1959: Exper. Cell Res. *18*, 374.
Terada, T.: Electronmicroscopic Studies on the Fine Structure of Myxomycete Plasmodia III; 23rd Ann. Meet. Botan. Soc. Japan, Fukuoka, Japan, Oct. 1958.
Ts'o, P. O., L. Eggman, and J. Vinograd, 1956: J. Gen. Physiol. *39*, 801.
— — — 1957: Biochim. Biophys. Acta *25*, 332.
Warren, S., and O. K. Scott, 1943: Proc. Soc. Exper. Biol. Med. *52*, 149.

Anschrift der Verfasser: Prof. Dr. Jean D. Bath and D. J. Dugas, University of California, Medical Center, Los Angeles 24, California (USA). School of Medicine, Dept. of Biophysics and nuclear Medicine.

Zum Nucleolus-Feinbau bei *Allium cepa*

Von

Heinz Falk

Aus dem Botanischen Institut der Universität Heidelberg

Mit 6 Textabbildungen

(Eingegangen am 14. Juli 1961)

Die elektronenmikroskopische Strukturanalyse des pflanzlichen Zellkernes hat bisher im Vergleich zur lichtmikroskopischen Karyologie nur wenig Neues erbracht (vgl. Geitler 1953; Wischnitzer 1960). Lediglich die Frage nach dem Feinbau der Kernhülle konnte weit über das lichtmikroskopisch Geklärte hinaus beantwortet werden (De 1957; Porter und Machado 1960; Whaley, Mollenhauer und Leech 1960a); dagegen stehen die für Cytogenetik und Genphysiologie gleichermaßen wichtigen Aufschlüsse über das submikroskopische Gefüge der Chromosomen noch aus. Dies mag einmal darin begründet sein, daß der Kern zwar funktionell gesehen ein hochgeordnetes System darstellt, topologisch betrachtet jedoch einen geringen Symmetriegrad besitzt. Wenn man bedenkt, daß etwa ein Zellkern von 20 μ Durchmesser erst durch 200—400 Ultradünnschnitte räumlich ganz erfaßt werden kann, so erscheint es schlechterdings unmöglich, aus einer vergleichsweise geringen Zahl tatsächlich erhaltener Einzelbilder eine Rekonstruktion vorzunehmen („geometrische Artefizierung", vgl. Sitte 1961). Erschwerend wirkt weiterhin der Mangel an speziell zur elektronenmikroskopischen Untersuchung des Zellkernes geeigneten Fixierungs- und Kontrastierungsmitteln. Bisher wurde hierfür fast ausschließlich OsO_4 eingesetzt, das bekanntlich eine große Zahl der verschiedensten Strukturelemente kontrastiert. Es erscheint daher berechtigt, einige Befunde mitzuteilen, die mit $KMnO_4$-Fixierung (Luft 1956; Mollenhauer 1959) an Kernen von *Allium-cepa*-Wurzelspitzenzellen gewonnen wurden.

Methode: Wurzelspitzen der Zwiebel (im Dunkeln bei etwa 22° C in Leitungswasser gewachsen, Wurzellänge einige Zentimeter) wurden in verschiedenen Konzentrationen von $KMnO_4$ unterschiedlich lange fixiert und in Butyl-Methyl-Methacrylat (9 : 1) eingebettet; Vergleichspräparate wurden in OsO_4 (1%, Palade 1952) fixiert und teilweise mit Pb kontrastiert (Watson 1958; mod. n. Dalton und Zeigel 1960). Die Schnitte wurden vor der elektronenoptischen Beobachtung mit

Kollodiumfolien überzogen (Watson 1957), wodurch die Auflösung feiner Strukturen nicht unwesentlich gesteigert werden konnte (vgl. Abb. 6 *c*).

Ergebnisse: Die bei $KMnO_4$-Fixierung meristematischer Pflanzenzellen von Mollenhauer (1959) angegebene Abhängigkeit des elektronenmikroskopischen Bildes von Fixans-Konzentration und -Einwirkungsdauer findet sich bei *Allium cepa* bestätigt: Das Chromatin der für Monokotyle charakteristischen Chromonemenkerne erscheint im Interphasenkern besonders deutlich bei relativ hoher $KMnO_4$-Konzentration (4,8%, 1h) als

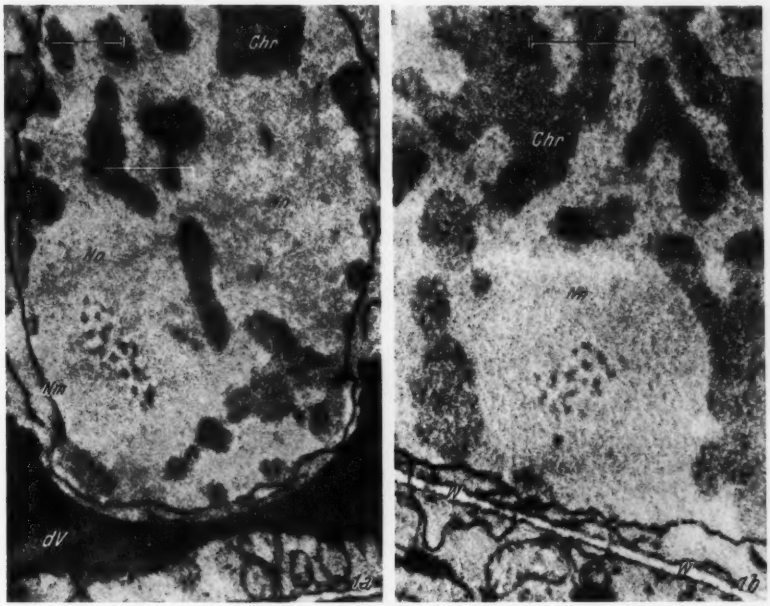


Abb. 1 *a, b*: Meristemzellen aus der Wurzelspitze der Zwiebel (*Allium cepa*). Permanganatfixierung (4,8%, 1h). Chromatin (*Chr*), Nucleolen (*Nn*) nicht kontrastiert, Kernhülle (*Nm*), dichte Vakuole (*dV*), Zellwand (*W*). Man beachte die Struktur in den Nucleolen.

unregelmäßig geformte Aggregationen feingranulären Materials — auch die Chromosomen der Mitosen werden in gleicher Weise dargestellt —, während die Nucleolarsubstanz nicht kontrastiert wird. Die Stelle der Nucleolen (gewöhnlich zwei) wird daher im Schnitt durch ± runde Bezirke repräsentiert, in denen in der Regel chromatisches Material fehlt (Abb. 1 *a*). Damit eröffnet sich die Möglichkeit zum Studium der Nucleolenbildungsstelle am Chromosom, die sich bei OsO_4-Fixation (z. B. Bernhard et al. 1952; Beermann und Bahr 1954; Horstmann und Knoop 1957; Yasuzumi et al. 1958; Lafontaine 1958; Rossner 1960; Peveling 1961 u. a.) durch den hohen Kontrast der Nucleolarsubstanz meist weniger deutlich darstellt.

Bei Durchmusterung permanganat-fixierter Meristemzellen nun finden sich in der Nucleolarregion von Interphasekernen nicht selten ± rundliche Flecke von im Mittel 0,1 μ Durchmesser, deren Massendicke derjenigen des Chromatins entspricht. Ob diese Strukturen den von Whaley et al. (1960 b) nach $KMnO_4$-Fixierung bei Mais für stoffwechselaktive Nucleolen erwähnten „various granules" entsprechen, ist fraglich; was sie nämlich auszeichnet, ist ihre nicht zu übersehende Regelmäßigkeit in der Anordnung: Stets

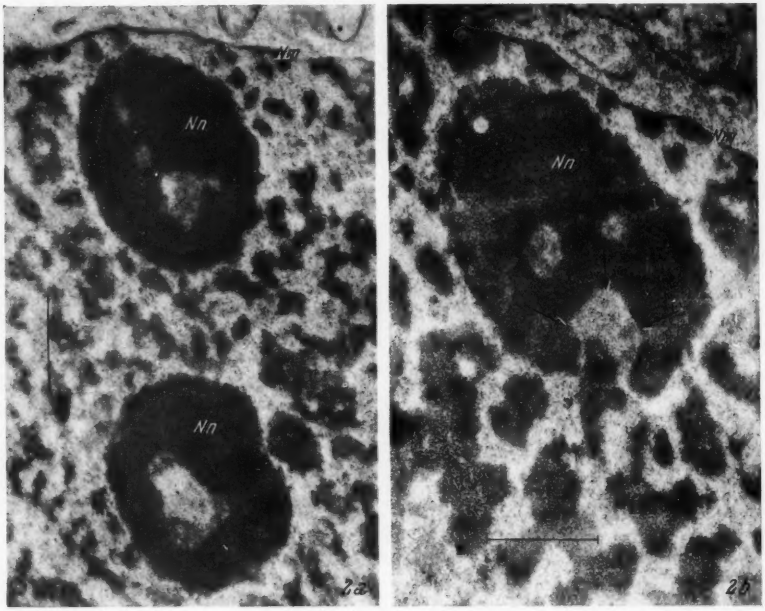
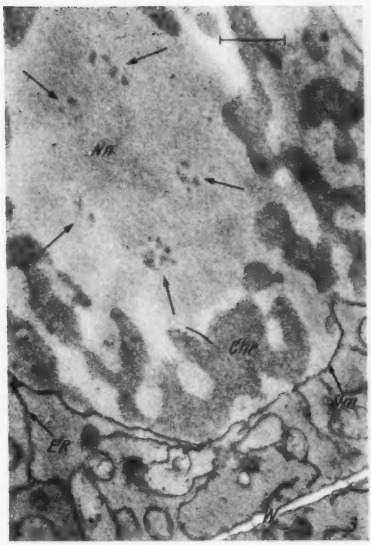
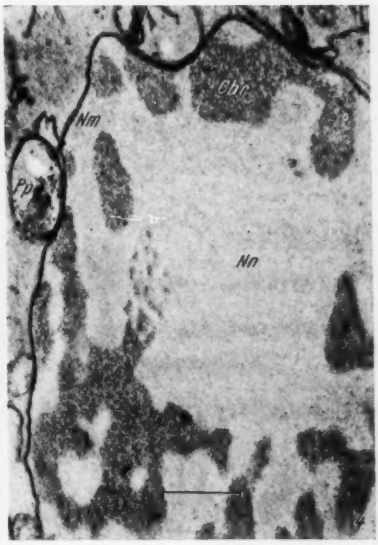


Abb. 2 *a*, *b*. OsO_4-Fixierung (1%, pH 7,2). Nucleolen (*Nn*) kontrastiert. Kernhülle (*Nm*). In Abb. 1 sichtbare Struktur undeutlich. Bei ↗, *b* Aufpleißen des eindringenden Chromatinstranges angedeutet.

findet man sie zu mehreren nebeneinander, häufig inmitten des Nucleolus (Abb. 1 *a*, *b*), gelegentlich aber auch konzentrisch verteilt (Abb. 3). Mitunter läßt sich beobachten, daß diese Strukturierung im Nucleolus mit chromatischem Kernmaterial in Verbindung steht (Abb. 4, 5): Ein kompakter Chromatinstrang löst sich in vier divergierende Reihen gegeneinander versetzter, gleich kontrastierter Bezirke auf, die sich 1 μ in den Nucleolarbereich hinein verfolgen lassen. Es ist wohl keine Frage, daß es sich hier um den Nucleolus-Organisator handelt (McClintock 1934; vgl. auch Kaufmann 1938). Leider blieb der Versuch, an Hand von Serienschnitten festzustellen, ob es sich um isolierte Partikel oder um die Durchstoßpunkte einer in ihrer Längsachse geschnittenen Doppelschraube (Resende 1940; Therman-Suomaleinen 1949) durch die Bildebene handelt, ohne eindeutiges Ergebnis.





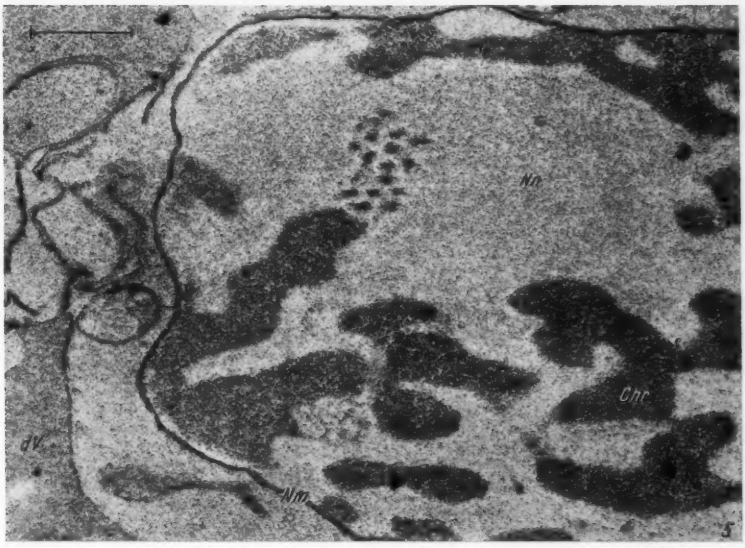


Abb. 3. Chromatin im *Nn* konzentrisch angeordnet (Abkürzungen vgl. Abb. 1). Endoplasmatisches Reticulum (*ER*). ($KMnO_4$-Fix.).

Abb. 4, 5. Nucleolus-Organisator an einem Chromatinstrang deutlich ($KMnO_4$-Fix.).

Mit OsO_4 fixierte Präparate vom selben Objekt zeigen bei günstiger Schnittlage gewissermaßen ein Negativ dessen, was mit $KMnO_4$ zur Darstellung gelangt: Der stark kontrastierte Nucleolus (Abb. 2 *a, b;* 6) umschließt einen weniger dichten Chromatinstrang wie der Hut eines jungen Pilzes seinen Stiel. Die feinere Struktur dieses Stranges ist jedoch bei weitem nicht so klar wie bei Permanganatfixation, so daß man, was dies angeht, kaum über die schon 1931 von Heitz gemachte Beobachtung hinaus etwas aussagen könnte. Das von Estable und Sotelo (1952) unter anderem für *Allium*-Wurzelmeristem beschriebene und elektronenoptisch in tierischem Gewebe dargestellte Nucleolonema (z. B. Yasuzumi et al. 1958) läßt sich in unseren Präparaten nicht beobachten; hingegen finden sich über die gesamte Nucleolarsubstanz unregelmäßig verteilt die von Lafontaine (1958a, b) erstmals auch für *Allium cepa* beschriebenen „dense particles", deren Zahl und Größe in den Nucleolen verschiedener Zellkerne recht unterschiedlich ist. Dabei fällt auf, daß diese elektronendichten Partikel durchaus nicht auf das Areal des Nucleolus beschränkt sind, sondern auch an anderen, zwar kleinen, immer aber distinkten Stellen des Kernraumes erscheinen (Abb. 6 *b*). Fraglos handelt es sich hierbei überall um Schwermetallniederschläge, deren eng umgrenztes Zustandekommen an eine diesen Orten eigene cytochemische Situation geknüpft ist (Äquivalentstruktur; vgl. Wohlfarth-Bottermann 1961). Es erscheint nicht ausgeschlossen, daß diese Stellen als Nebennucleolen (Heitz 1931; Geitler 1938), Balbiani-Ringen und „puffs" von Dipterenspeicheldrüsenchromosomen (z. B. Bauer 1935; Beermann und Bahr 1954; Mechelke 1961) in etwa vergleichbar, aufzufassen sind.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für ihre Unterstützung.

Zusammenfassung

Nucleolen im Wurzelmeristem von *Allium cepa* (Permanganatfixation) enthalten regelmäßig angeordnete chromatische Strukturen, die als Nucleolus-Organisator angesprochen werden. „Dense particles" (Lafontaine 1958) treten nach OsO_4-Fixierung außer im Nucleolus an mehreren eng umgrenzten Kernarealen auf, für die eine Analogie zu bestimmten Bildungen an Polytänchromosomen vermutet wird.

Summary

Nucleoli in meristematic cells of onion root tips fixed using permanganate contain regularly arranged structures of chromatin material which are considered to be nucleolus organizers. After OsO_4 fixation, "dense particles" (Lafontaine 1958) appear not only in the nucleolus but also in small areas of the nucleus. This observation is discussed in relation to the puffs in polytene chromosomes.

Abb. 6. Kernausschnitt. Der Nucleolus umschließt einen Chromatinstrang. „Dense particles" (vgl. Text) im *Nn* (*a*) und in anderen chromatischen Strukturen (↗, *b*). Annuli (*Np*), Zellwand (*W*) mit Plasmodesmen (↗), Proplastiden (*Pp*), Mitochondrien (*M*). *c*: Plasmalemma als Elementarmembran („unit membrane") aufgelöst. (OsO_4-Fix., Pb-Kontrast., Kollodium-„sandwiched".)

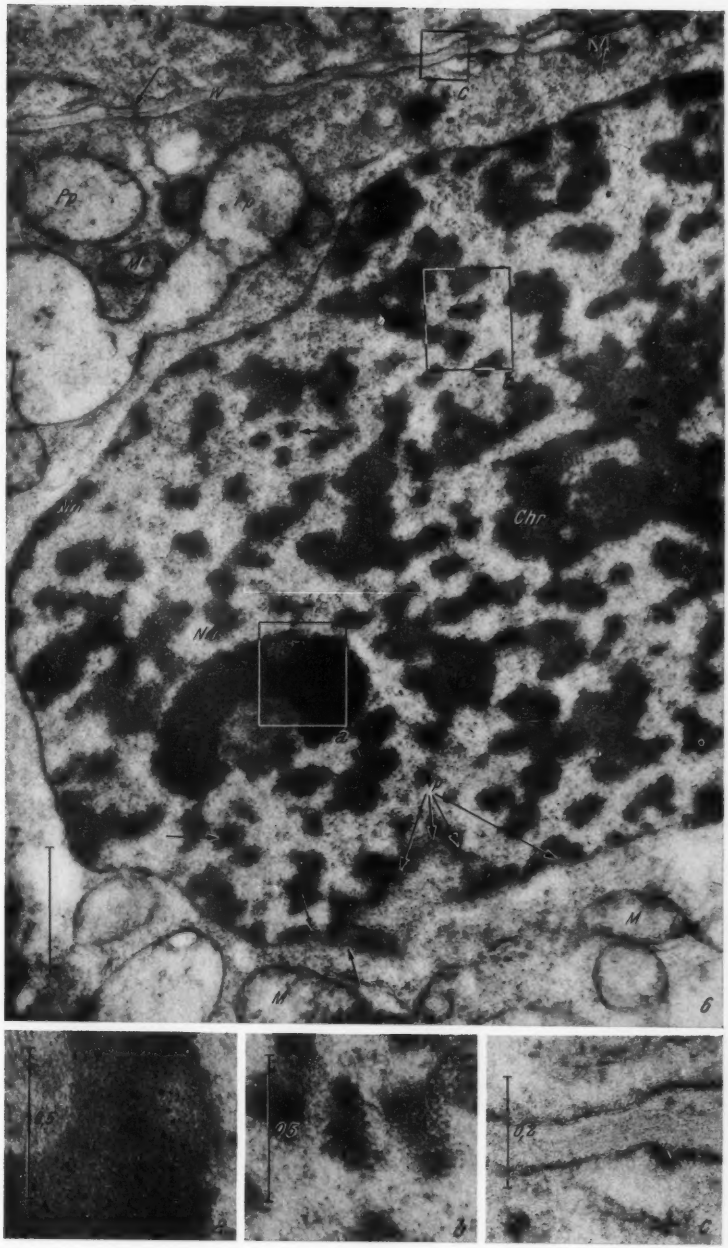


Abb. 6.

Literatur

Bauer, H., 1935: Der Aufbau der Chromosomen aus den Speicheldrüsen von *Chironomus Thummi* Kiefer. Z. Zellforschg. *23*, 280—313.

Beermann, W., and G. F. Bahr, 1954: The submicroscopic structure of the Balbiani-ring. Exper. Cell Res. *6*, 195—201.

Bernhard, W., F. Haguenau, et Ch. Oberling, 1952: L'ultra-structure du nucléole de quelques cellules animales, révélée par le microscope électronique. Experientia *8*, 58—59.

Dalton, A. J., and R. F. Zeigel, 1960: A simplified method of staining thin sections of biological material with lead hydroxide for electron microscopy. J. Biophys. Biochem. Cytol. *7*, 409—410.

De, D. N., 1957: Ultrastructure of nuclear membrane of plant cells. Exper. Cell Res. *12*, 181—184.

Estable, C., and J. R. Sotelo, 1952: Technical procedures for the study of the nucleolonema. Stain Technol. *27*, 307—312.

Geitler, L., 1938: Über das Wachstum von Chromozentrenkernen und zweierlei Heterochromatin bei Blütenpflanzen. Z. Zellforschg. *28*, 133—153.

— 1955: Normale und pathologische Anatomie der Zelle. In: W. Ruhland, Handbuch d. Pflanzenphysiologie *1*, 123—167, Berlin-Göttingen-Heidelberg.

Heitz, E., 1931: Die Ursache der gesetzmäßigen Zahl, Lage, Form und Größe pflanzlicher Nukleolen. Planta *12*, 775—844.

Horstmann, E., und A. Knoop, 1957: Zur Struktur des Nukleolus und des Kernes. Z. Zellforschg. *46*, 100—107.

Kaufmann, B. P., 1938: Nucleolus-organizing regions in salivary gland chromosomes of *Drosophila melanogaster*. Z. Zellforschg. *28*, 1—11.

Lafontaine, J. G., 1958 a: A particulate component found in nucleoli of *Allium cepa* and *Vicia faba*. J. Biophys. Biochem. Cytol. *4*, 229—230.

— 1958 b: Structure and mode of formation of the nucleolus in meristematic cells of *Vicia faba* and *Allium cepa*. J. Biophys. Biochem. Cytol. *4*, 777—784.

Luft, J. H., 1956: Permanganate—a new fixative for electron microscopy. J. Biophys. Biochem. Cytol. *2*, 799—802.

McClintock, B., 1934: The relation of a particular chromosomal element to the development of the nucleoli in *Zea mays*. Z. Zellforschg. *21*, 294—328.

Mechelke, F., 1961: Das Wandern des Aktivitätsmaximums im Br_4-Locus von *Acricotopus lucidus* als Modell für die Wirkungsweise eines komplexen Locus. Naturw. *48*, 29.

Mollenhauer, H. H., 1959: Permanganate Fixation of Plant Cells. J. Biophys. Biochem. Cytol. *6*, 431—436.

Palade, G. E., 1952: A study of fixation for electron microscopy. J. Exper. Med. *95*, 285.

Porter, K. R., and R. D. Machado, 1960: Studies on the endoplasmic reticulum IV. Its form and distribution during mitosis in cells of onion root tip. J. Biophys. Biochem. Cytol. *7*, 167—180.

Resende, F., 1940: Über die Chromosomenstruktur in der Mitose der Wurzelspitzen. II. SAT-Differenzierungen, Spiralbau und Chromonemata. Chromosoma *1*, 486—520.

Rossner, W., 1959: Beobachtungen an Ultradünnschnitten zu verschiedenartigem Heterochromatin im Interphasenkern des weißen Senfes. Vortrag, 9. Tagung d. Deutschen Ges. f. Elektronenmikroskopie, Freiburg/Br.

Sitte, P., 1961: Die submikroskopische Organisation der Pflanzenzelle. Ber. dtsch. bot. Ges. *74*, 177—206.

Thermann-Suomaleinen, E., 1959: Investigations on secondary constrictions in polygonatum. Hereditas *35*, 86—108.

Watson, M. L., 1957: Reduction of heating artifacts in thin sections examined in the electron microscope. J. Biophys. Biochem. Cytol. *3*, 1017—1022.

— 1958: Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metalls II. Application of solutions containing lead and barium. J. Biophys. Biochem. Cytol. *4*, 727—730.

Whaley, W. G., H. H. Mollenhauer, and J. H. Leech, 1960 a: Some observations on the nuclear envelope. J. Biophys. Biochem. Cytol. *8*, 233—245.

— — — 1960 b: The ultrastructure of the meristematic cell. Amer. J. Bot. *47*, 401—449.

Wischnitzer, S., 1960: The ultrastructure of the nucleus and nucleocytoplasmic relations. Intern. Rev. Cytol. *10*, 137—162.

Wohlfarth-Bottermann, K. E., 1961: Cytologische Studien VII. Strukturaspekte der Grundsubstanz des Cytoplasmas nach Einwirkung verschiedener Fixierungsmittel. Protoplasma *53*, 259—290.

Yasuzumi, G., T. Sawada, R. Sugihara, M. Kiriyama, and M. Sugioka, 1958: Electron microscope researches on the ultrastructure of nucleoli in animal tissues. Z. Zellforschg. *48*, 10—23.

Anschrift des Verfassers: Dr. H. Falk, Botanisches Institut der Universität, Heidelberg, Hofmeisterweg 4.

Kurze Mitteilung

Leafhopper-Transmitted Plant Viruses: Few Additions

By

B. B. Nagaich, Ashokebati, Simla-E, India

(Received April 17, 1961)

A discussion on leafhopper-transmitted plant viruses has been published by Maramorosch (1960). However, the South East Asian work on this subject has not been reviewed. The purpose of this note is, therefore, to present the available information on the leafhopper-transmitted plant viruses in India, Burma, and Java. The work on such viruses is being conducted mainly at the Indian Agriculture Research Institute, New Delhi, India and the Faculty of Agriculture, Bogor, Java.

Vasudeva and Sahambi (1955) reported a phyllody disease in *Sesamum orientale L.* The disease is incited by a virus transmitted by the leafhopper, *Deltocephalus* sp. The host range of the virus is very wide. The leafhoppers carry the virus for a very long time, sometimes for the whole life. Studies on its relationship with other viruses and on the virus-vector relationship are in progress. A similar disease was also reported from Burma (Rhind *et al.*, 1937).

Bergman (1956) and Thung and Hadiwidjaja (1957) studied Witches' broom diseases of leguminous crops. The diseases are incited by the virus transmitted by a leafhopper, *Orosius argentatus.* The latent period of the virus in the vector is about 10 days. Once the leafhoppers become viruliferous, they carry the virus for several months.

References

Bergman, B. H. H., 1956: Tijdschr. Plziekt. *62*, 291—304 (Engl. Summ.).
Maramorosch, K., 1960: Protoplasma *LII*, 458—466.
Rhind, D., *et al.*, 1937: Ind. J. Agric. Sci. *7*, 823—840.
Thung, T. H., and T. Hadiwidjaja, 1957: Tijdschr. Plziekt. *63*, 58—63 (Engl. summ.).
Vasudeva, R. S., and H. S. Sahambi, 1955: Ind. Phytopath. *8*, 124—129.

Anschrift des Verfassers: Dr. B. B. Nagaich, Askokebati, Simla-E (India).

Referate

Chambers, R., und E. L. Chambers: Explorations into the Nature of the Living Cell. Mit XVI, 352 Seiten, 111 Abb., 6 Tabellen. Published for the Commonwealth Fund. Cambridge, Mass.: Harvard University Press. 1961. $ 8,—.

Wie aus dem Vorwort hervorgeht, wurde der interessante Band von R. Chambers im letzten Jahrzehnt seines Lebens (1947—1957) begonnen und nach seinem Ableben durch seinen Sohn, E. L. Chambers, vollendet. Ein Bild des Forschers und eine kurze Biographie leiten das Buch ein. Bekanntlich war es R. Chambers, der einen der beiden ersten voll gebrauchsfähigen Mikromanipulatoren konstruierte und dann unter Verwendung dieses Gerätes die Technik der Mikromanipulation zur Vollkommenheit entwickelte. Die vorliegende Darstellung seines Lebenswerkes ist in Gestalt einer allgemeinen Anatomie, Morphologie und Physiologie des Protoplasmas dargeboten, deren Stoff eindrucksvollerweise hauptsächlich aus dem Inhalt der mehr als 240 Publikationen und aus weiteren unveröffentlichten Ergebnissen des Autors besteht und nur durch eine bescheidene Zahl fremder Literaturzitate ergänzt werden mußte. (So hat das allgemeine Literaturverzeichnis am Ende des Bandes nur etwa den doppelten Umfang der ihm vorhergehenden Liste der Originalarbeiten von R. Chambers und Mitarbeitern.) Wenn man gewohnt ist, in der Mikrurgie eine von der Methode her bestimmte Arbeitsrichtung zu sehen, in der sich Forschungsvorhaben und Objektwahl den technischen Voraussetzungen vielfach unterordnen, wird man durch das umfassende Forschungsprogramm dieses größten Mikrurgen belehrt, daß dieses Primat des Technischen nicht notwendig bestehen muß. Man erkennt weiter, einen wie großen Anteil unserer Kenntnis von der physikalischen Beschaffenheit des lebenden Zellinhaltes wir den Untersuchungen von Chambers und Mitarbeitern zu danken haben.

Es kann hier nur kurz des besonderen Reizes gedacht werden, welcher in dem direkten Eingriff in die lebende Substanz liegt, wie ihn nur die Mikrurgie ermöglicht. Der Titel des Buches, kaum wörtlich ins Deutsche übersetzbar, deutet ein wenig die Stimmung des Abenteuers an, das jeder solche Versuch darstellt — und von dieser Art Experimente handelt der ganze Band.

Von den 8 Kapiteln und einem Anhang methodischen Inhalts handeln sieben von der physikalischen Beschaffenheit und der physiologischen Reaktion des Protoplasmas. Das erste schildert Plasma und Kern als hochorganisierte Einheit der lebenden Materie und zeigt, wie durch Mikrodissektions- und Mikroinjektionsversuche seine physikalischen Eigenschaften und Einzelheiten der Strukturen erfaßt werden. Es folgt (2.) die Behandlung der äußeren Hüllen (extraneous coats) der Pflanzen- und Tierzelle (Echinodermen-Eier). Die mikrurgische Analyse der differenzierten Plasmabezirke an der Zelloberfläche von Amöben, Vorticellen, Paramecien, dann die Entfernung der äußeren Hüllen der Echinodermen-Eier und die Veränderung dieser Hüllen bei der Befruchtung ist geschildert. Die Zellulosemembran der Pflanzen bietet den Mikroinstrumenten ein stärkeres Hindernis, das durch entsprechende Präparationsmethoden zu überwinden ist. Das 3. Kapitel handelt von den eigentlichen Grenzschichten der Protoplasten. Die klassischen mikrurgischen Versuche über die Natur der Grenzschichten von Plasma und Vakuole (Chambers u. Höfler) leiten das Studium der physikalischen Eigenschaften dieser Oberflächenfilme ein, ihre Neubildung nach mechanischen Insulten wird berührt und schließlich wird unter Einbeziehung der elektronenmikroskopischen Erkenntnisse eine sehr ansprechende Hypothese über Eigenschaften dieses Oberflächenfilmes vorgelegt, die vor allem dem (im physikalischen Sinne verstanden) dynamischen Charakter dieser Struktur gerecht wird. Es wird angenommen, daß die orientiert stehenden Lipo-

proteidmoleküle besonders bei Größenänderungen der Protoplastenoberfläche zwischen Oberfläche und Binnenplasma wechseln und unter dem Einfluß von Ionen des Außenmediums auch in dieses übertreten können. Kap. 4 handelt von der Wirkung der Salze (Ionen) auf das Binnenplasma, wobei Immersionsversuche und Injektionsversuche (an Amöben, Plasmodien, Wurzelhaaren) einander gegenübergestellt werden. Die Mikroinjektionsversuche vermitteln Kenntnisse von der Reaktionsweise des Binnenplasmas gegenüber den ein- und zweiwertigen Ionen, welche durch Immersionsversuche nicht zu erreichen sind. Kap. 5 ist der Bestimmung der Wasserstoffionenkonzentration im Innern von Plasma und Kern gewidmet. Nur durch Mikroelektroden und insbesondere durch die Mikroinjektion von Indikatoren ist die Reaktion des lebenden, nicht irritierten Plasmas zu erfassen. Die Anwendung der Indikatoren nach Clark und Lubs, die als sulfonsaure Verbindungen nicht permeieren und als solche auch weder von den Lipoiden noch von den ungeschädigten Proteinen des Plasmas gespeichert werden, war Voraussetzung des Erfolges. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in einer Tabelle beigegeben. Im folgenden, sechsten Abschnitt ist die Aufnahme von Farbstoffen durch Diffusion (Permeation) der aktiven Aufnahme insbes. sulfosaurer Farbstoffe (durch Nieren- und Leberzellen) gegenübergestellt und mit dem Ergebnis von Injektionsversuchen in Plasma und Vakuole von Pflanzenzellen verglichen. Kap. 7 befaßt sich mit den Veränderungen des physikalischen Plasmazustandes bei der Zell- und Kernteilung tierischer Eizellen und speziell mit der Beschaffenheit und vermutlichen Funktion der Astrosphären und der Spindel in Echinodermen-Eiern.

Im Kapitel 8 ist schließlich eine Übersicht über die Untersuchungsmethode der Mikromanipulation und eine Anleitung dazu gegeben. Es wird hervorgehoben, daß die Mikrurgie die tiefgehendsten Eingriffe unter Wahrung des Lebenszustandes und der Einheit der lebenden Protoplasten erlaubt und damit den analytischen Methoden, welche in der Hauptsache mit geschädigtem, desintegriertem Plasma arbeiten müssen, überlegen ist. Die von Chambers entwickelte Apparatur ist eingehend geschildert und anschließend eine Anzahl wichtiger Versuchstypen unter Angabe der technischen Einzelheiten beschrieben. Der Anhang befaßt sich mit den Behelfen der mikrurgischen Arbeit (Mikroskop, feuchte Kammer, Einrichtung zur mechanischen Anfertigung von Mikroinstrumenten usw.) und gibt schließlich detaillierte Anweisungen zur Durchführung der Mikroinjektion und im besonderen der intrazellulären pH-Bestimmung. Der ausübende Mikrurg wird diese letzten Abschnitte als eine Art Vermächtnis des Altmeisters dankbar entgegennehmen.

L. Hofmeister (Wien).

Handbuch der Pflanzenphysiologie. — Encyclopedia of Plant Physiology. Herausgegeben von W. Ruhland in Gemeinschaft mit verschiedenen Fachgelehrten. Band XII: Pflanzenatmung einschließlich Gärungen und Säurestoffwechsel. Bearbeitet von verschiedenen Fachgelehrten. Redigiert v. J. Wolf. Teil 1: Mit 137 Abb., CCLXXX, 1121 S. Teil 2: Mit 215 Abb., XX, 1421 S. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer-Verlag 1960. Teil 1 und 2: Ganzleinen DM 598.—, Subskr.-Preis DM 478.40.

Nun liegt der umfangreichste Band des großen Werkes vor uns, das damit zu etwa zwei Dritteln vollendet ist. Die Initiative zu diesem gewaltigen Unternehmen und die Arbeitsleistung des Herausgebers, der Redakteure und Mitarbeiter verdienen ehrliche Bewunderung. Dem Herausgeber war es nicht beschieden, den Fortgang des Werkes noch weiter zu erleben. Sein Bild und ein Nachruf von H. Ullrich stehen am Beginn des ersten Teilbandes. Dann folgen insgesamt 2349 Seiten Text und 473 Seiten Register. Der Rezensent ist also nicht in jeder Hinsicht beneidenswert — und dies nicht

nur der Menge des angehäuften Stoffes wegen, sondern auch bezüglich des Problems der Wertung dieses literarischen Kolosses.

Das Unternehmen, ein Handbuch zu schreiben, ist heute besonders in zweierlei Hinsicht problematisch: Einerseits durch den raschen Fortschritt unserer Erkenntnis (dies gilt ganz besonders für das Gebiet des vorliegenden Bandes), anderseits durch die Tatsache, daß nicht alles, was in der Literatur berichtet wird, wahr ist. Es gibt in dem ungeheuer angeschwollenen Strom der Publikationen natürlich auch Versuchs- und Denkfehler, Unzulängliches, Halbwahres und Belangloses, es gibt Hypothesen, die sich den Schein der Wahrheit erschlichen haben und mancherlei mehr. Demgegenüber haben nicht einmal die Verfasser der einzelnen Beiträge die Möglichkeit, alle von ihnen benützten Originalarbeiten auf ihre Richtigkeit hin zu prüfen. Sie können zumeist nur die Ergebnisse der verschiedenen Autoren übernehmen, sie als mehr oder weniger wahrscheinlich betrachten und in das Bild des von ihnen behandelten Teilgebietes einzubauen versuchen. An diesem Vorgang ist nichts zu kritisieren. Er entspricht der gegenwärtigen Situation der Wissenschaft und den Aufgaben eines Handbuches. Es tut aber doch gut, sich bei solcher Gelegenheit der Grenzen zu erinnern, die unserer Erkenntnis gesetzt sind. Der Respekt vor dem vorliegenden Werk sollte nicht einmal im Unterbewußtsein zu dem Gedanken führen, daß hier Abschließendes und Endgültiges gesagt wird. Das Ruhlandsche Handbuch ist eine wichtige Station auf dem Wege der Pflanzenphysiologie — nicht weniger und nicht mehr. In diesem Zusammenhange sei auch ein Passus erwähnt, den J. Wolf in seinem Einführungsartikel schreibt: Er stellt (S. LXVII) fest, daß das Wort „Atmung" von verschiedenen Autoren in recht verschiedenem Sinne gebraucht wird und meint, es wäre Aufgabe eines kompetenten internationalen Gremiums, hier Ordnung zu schaffen. Dazu muß gesagt werden, daß zwar Übereinkünfte gelegentlich nötig sind, daß wir uns aber von Beschlußfassungen gerade hier nicht zu viel versprechen sollen. Es geht doch hier — anders als etwa bei einer Artbenennung — nicht darum, eine international anerkannte Bezeichnung für etwas zu finden, sondern es gilt, einen bestimmten Teilaspekt des vielfältig verknüpften biologischen Geschehens so abzugrenzen und begrifflich zu fassen, daß das Wort der Sache gerecht wird. Dies geschieht aber nicht durch Beschlüsse von Gremien, sondern durch die Inspiration eines genialen Menschen. Sollten wir nicht hoffen dürfen, daß die Wissenschaft etwas Lebendiges und Entwicklungsfähiges ist, in dem Unnützes von selbst ausstirbt und zukunftsträchtige Gedanken sich entfalten? Nur sofern sie dies ist, wird unsere Wissenschaft Zukunft haben und wird auch das vorliegende Handbuch dieser Zukunft dienen.

Nun zu dem, was dem Referenten im einzelnen beim Durchblättern der beiden Bände auffiel. Erfreulich ist vor allem der einleitende Artikel von J. Wolf. Auf 239 Seiten bringt er hier nicht nur eine Einführung in die Disposition, sondern darüber hinaus beinahe eine Art Lehrbuch über das Stoffgebiet des Bandes XII, dessen Lektüre genußreich und empfehlenswert ist. Zu erwähnen ist innerhalb dieses Artikels das Kapitel „Biologische Energetik", das das schwierige Gebiet auf wenigen Seiten knapp und klar umreißt. Es ist freilich nicht für Anfänger geschrieben, gibt aber dem, der sich schon einmal mit der Materie beschäftigt hat, eine eindrucksvolle Rekapitulation des Wesentlichen. Eine zweite Aufgabe des einführenden Artikels ergab sich daraus, daß (aus Gründen, die dem Referenten nicht bekannt sind) die Zeitspanne zwischen der Abfassung der Beiträge und dem Erscheinen des Bandes etwas größer war als dies sonst der Fall zu sein pflegt. Die in den Beiträgen zitierte Literatur reicht im allgemeinen bis 1957, gelegentlich bis 1958. J. Wolf hat nun in seinem einführenden Artikel in anerkennenswerter Weise versucht, auch die 1958 und 1959 erschienene Literatur dem Leser noch zugänglich zu machen.

Aus der Fülle der nun folgenden einzelnen Beiträge konnte selbstverständlich nur eine Auswahl tatsächlich gelesen werden. Diese Auswahl, die notwendigerweise subjektiv sein mußte, ist natürlich nicht ohne Einfluß auf die Besprechung geblieben, wofür um Verständnis gebeten wird.

Die Disposition des Bandes sieht drei Hauptteile vor: I. Chemismus der Atmung und Gärung (1. Teilband), II. Biologie der Atmung und III. Säurestoffwechsel (2. Teilband). Dem ersten Hauptteil ist ein historischer Überblick von M. Thomas vorangestellt. Nach einem Kapitel über die Materialien der Atmung und Gärung (von G. Krotkov und H. Engel) ist der weitere Stoff in zwei Teile zerlegt: Einerseits die physiko-chemischen Voraussetzungen und die Behandlung der einzelnen Enzym-Individuen, anderseits die Besprechung der vollständigen Abbauwege im Stoffwechselgeschehen. Im ersten Teil findet sich (nach einem Einführungsartikel von G. v. Ehrenstein und R. Bonnichsen) ein höchst komprimierter, fast lehrbuchartiger Artikel von E. C. Slater über Redoxpotentiale und Wasserstoffübertragung. R. S. Bandurski versucht die Gruppenpotentiale und die Rolle der Phosphate in der Energieübertragung zu erläutern. Es folgt ein mehr deskriptiver Teil, in dem die einzelnen Oxydationsenzyme abgehandelt werden. Hier schreibt K. Hasse über Pyridinnucleotid-Dehydrogenasen, H. Schleyer über die Succino-Dehydrogenase, H. Lundegårdh über das Cytochrom-System, R. H. Burris über Peroxydase und Katalase, Wolfgang Franke über Phenoloxydasen und Ascorbinsäure-Oxydase, W. Zoberst über Fermente mit unbekannter Wirkgruppe und B. Vennesland über die Decarboxylasen. Wo man hier auch blättert, man hat überall den Eindruck von solider und sachlicher Arbeit. Der Aufsatz von Franke ist auf einem umstrittenen Gebiet vorbildlich nüchtern und kritisch.

Im Abschnitt „Abbauwege" wird unterschieden zwischen vollständiger oxydativer Dissimilation der Kohlenhydrate (Sauerstoffatmung) und unvollständiger Dissimilation von Zuckern, worunter die Gärungen in weitestem Sinne verstanden werden. Erstaunlicherweise ist die Veratmung von Fetten und Proteinen nicht einmal anhangsweise behandelt. Proteine dürften in der Pflanze wohl relativ selten (etwa in etiolierten Leguminosenkeimlingen) veratmet werden, Fette aber doch sicher recht häufig. Da diese Vorgänge im Protein- und Fettband des Handbuches nicht ausführlich behandelt werden, hätte man sie wohl hier anzutreffen erwartet. Was die Kohlenhydrate betrifft, findet der Leser in diesem Abschnitt allerdings einige Leckerbissen in Gestalt von Aufsätzen hervorragender Fachgelehrter. Zunächst berichtet H. G. Albaum über die Phosphorylierung der Zucker, dann D. Müller über den Pentosephosphatzyklus. Die Glykolyse wird von P. K. Stumpf, das Problem des aktivierten Acetates in einem souverän geschriebenen und auch historisch interessanten Artikel von K. Decker und F. Lynen, der Krebs-Zyklus von A. Millerd behandelt. Im Gärungsteil stehen voran die Oxydations-Gärungen: Direkte Oxydation von nicht phosphorylierten Zuckern zu Hexonsäuren u. dgl., bearbeitet von D. Müller, und die Essigsäuregärung, bearbeitet von A. Janke. Es folgen die Gärungen im engeren Sinne (anoxydative Dissimilation). Hier beschreiben H. Haehn † die Biologie der Hefe, K. Myrbäck die alkoholische Gärung, Wilhelm Franke und K. Buchta die Milchsäuregärung, C. H. Werkmann und G. H. Nelson die Propionsäuregärung und C. H. Werkman die Buttersäure-Butylalkoholgärung und die Ameisensäuregärung. Dem Artikel über die Milchsäuregärung ist ein Aufsatz von A. Schneider über die Milchsäure in höheren Pflanzen zur Seite gestellt, während die Gärungserscheinungen bei höheren Pflanzen erst später unter dem Titel „Biologie der Atmung" behandelt werden. Ein vergleichender Überblick über die Gärungen (von C. H. Werkman) und ein Artikel über die enzymatische Regulation von Atmung und Gärung (von H. Holzer und A. Holldorf) beschließen diesen Teil des Werkes und damit auch den ersten Teilband.

Der zweite Teilband beginnt mit einem Abschnitt, der den nicht ganz treffenden Titel trägt: „Analyse der Atmungsvorgänge". Es handelt sich dabei nämlich nicht um methodische Angaben, sondern hier berichtet zunächst M. Thomas über den Respirationsquotienten und seine diagnostische Bedeutung sowie D. P. Hackett über Atmungshemmstoffe. Es folgt der Hauptabschnitt des zweiten Teilbandes unter dem Titel „Biologie der Atmung". Hier werden zum Anfang die Wechselbeziehungen zwischen Atmung und Gärung bei höheren Pflanzen behandelt, und zwar berichtet J. S. Turner über Gärung bei höheren Pflanzen und den Pasteur-Effekt und A. Betz über das interessante und noch nicht ganz geklärte Problem der aeroben Gärung in Meristemen. Breiteren Raum nimmt die Darstellung des Einflusses äußerer Faktoren ein: Die Zusammensetzung der Atmosphäre bespricht W. Stiles, Gasströmungen in Pflanzen H. Ullrich, die Zusammenhänge zwischen Atmung und Wasserhaushalt behandeln B. Huber und H. Ziegler. P. J. Syrett berichtet über den Effekt der Mineralsalze auf die Pflanzenatmung und H. Lundegårdh über sein Konzept der Anionenatmung (vgl. weiter unten). Ferner wird der Einfluß der Temperatur (D. F. Forward) und die Wirkung verschiedener Strahlungen behandelt (G. Rosenstock, A. Ried, U. Hagen und H. Langendorff). Die Wirkung von Wuchsstoffen und anderen organischen Verbindungen besprechen J. C. Fidler und L. J. Audus, dem Einfluß von Verletzungen und Infektionen gilt ein posthumer Aufsatz des tragisch früh verstorbenen F. Eberhardt.

Ein nicht voll befriedigendes Kapitel sind die erwähnten Ausführungen von Lundegårdh über die Anionenatmung. Ausgehend von interessanten und wichtigen Grundbeobachtungen (z. B. der zunächst adsorptiven Bindung der Kationen oder der verstärkten Atmung bei Ionenaufnahme) hat sich Lundegårdh auf Vorstellungen versteift, die nicht haltbar sind, aber doch mit großer Überzeugungskraft vorgetragen werden. In den Kreisen der auf diesem Fachgebiet Arbeitenden beginnt sich in der letzten Zeit (vgl. G. G. Laties in „Annual Review of Plant Physiology", Bd. 10, 1959, S. 94) eine Einsicht durchzusetzen, die der zellphysiologisch-mikroskopisch Geschulte schon an Hand einfacher Vitalfärbeversuche zu demonstrieren imstande ist: Daß nämlich der Ort der Austauschadsorption der Kationen nicht die Oberfläche des Cytoplasmas, sondern die Zellwand ist. So liegt also wohl auch die negative Ladung, die Lundegårdh an der Oberfläche von Wurzeln gemessen hat, nicht am Protoplasma, sondern an der Zellwand. Man kann es auf Grund der vorliegenden Ergebnisse als wahrscheinlich betrachten, daß sowohl Anionen als auch Kationen durch einen stoffwechselaktiven Mechanismus in die Zelle gebracht werden, wobei die Kationen durch die Austauschadsorption an der Zellwand zunächst begünstigt erscheinen, wenn man Analysen des Gesamtgewebes durchführt. Lundegårdhs Vorstellungen von einem Kationentransport durch rotierende Träger und von einer Cytochromleiter, an der entlang sich die Anionen in den Zellsaft hanteln, mögen wohl in früherer Zeit als Arbeitshypothesen tauglich gewesen sein, müssen aber auf Grund neuerer Befunde, vor allem betreffend die Lokalisation des Cytochromsystems, wohl aufgegeben werden. Das experimentelle Verdienst Lundegårdhs bleibt natürlich von diesen Darlegungen unberührt.

Der dritte Teil des Abschnittes „Biologie der Atmung" trägt den Titel: Atmung und Entwicklung. Zunächst werden die niederen Pflanzen behandelt (J. Christophersen: Bakterien und Pilze, C. P. Wittingham: Algen, A. Quispel: Flechten, W. Stiles: Moose und Farne). Für die höheren Pflanzen berichtet W. Stiles über die Verhältnisse bei der Keimung und Entwicklung der Samen, C. A. Price über die vegetativen Organe, H. Fischer über die Blüten und J. B. Biale über die Früchte. Ein kurzer Aufsatz von E. Bünning behandelt abschließend die endogene Rhythmik der Atmung.

Der letzte Teil des Bandes ist dem Säurestoffwechsel gewidmet, der eventuell auch in einem anderen Band des Handbuches (z. B. bei den Kohlen-

hydraten) hätte behandelt werden können, da er ja eine ganze Reihe von Stoffwechselgebieten miteinander verbindet. Die Disposition des Bandes (wie man auf S. LXIV erfährt, wurde dieselbe noch von K. Paech angelegt) sieht vor, den Säurestoffwechsel im Zusammenhang mit der Atmung zu behandeln — und er steht hier tatsächlich auf einem guten Platz. Zunächst wird (von S. M. Martin) die Säureproduktion der Pilze besprochen, die ja eine gewisse Sonderstellung einnimmt, weil sie eher zu den Gärungen in Beziehung steht. Das Vorkommen und den Stoffwechsel organischer Säuren bei Algen haben G. E. Fogg und J. W. Millbank bearbeitet. Zum Säurestoffwechsel der höheren Pflanzen findet sich zunächst ein interessanter Artikel von J. Carles, der die Ganzheit des Lebendigen in den Blick zu bekommen versucht, und zwar zunächst die Ganzheit des Lebenslaufes der Pflanze, die hier sehr hübsch als Aufeinanderfolge dreier Stoffwechselperioden aufgefaßt wird: Das Leben auf Kosten des Samens, das autonome Leben und das Leben auf den Samen hin. Zwei spezielle Aufsätze folgen dieser Übersicht, einer über den Säurestoffwechsel bei der Samenbildung und Samenkeimung (von L. Fowden und V. Moses) und ein zweiter über den der fleischigen Früchte. Hier berichtet uns der Bandredakteur J. Wolf von seinem eigenen Arbeitsgebiet. Den gleichen Verfasser hat der Beitrag über den diurnalen Säurerhythmus mit dem interessanten Phänomen der CO_2-Bindung im Dunkeln, das in der letzten Zeit sehr intensiv bearbeitet worden ist. Die Abfassung dieses Artikels war sicher wegen der raschen Folge neuer und zum Teil widersprechender Befunde besonders schwierig. Trotzdem ist es dem Autor gelungen, die Literatur bis 1959 nicht zur zu zitieren, sondern auch zu verarbeiten. Schließlich schrieb W. M. Crombie noch einen Aufsatz über die „extrazyklischen" organischen Säuren, d. h. jene, die nicht im Krebszyklus enthalten sind, wie z. B. Oxalsäure, Weinsäure und die aromatischen Säuren.

Als Abschnitt VI des Gesamtbandes schließt sich nun noch ein Aufsatz von D. Müller über den Kreislauf des Kohlenstoffes an.

Die Arbeit des Redakteurs und seiner Mitarbeiter ist damit beendet. Wir wollen ihnen herzlich Dank sagen für ihre Mühe, durch die sie uns die Möglichkeit gegeben haben, auf einem bestimmten Punkte unseres Weges innezuhalten und das bisher Erreichte zu überschauen. Nun beginnt die Arbeit des Lesers. Diese besteht nicht nur darin, sich die hier gebotenen Kenntnisse anzueignen. Es ergeben sich vielmehr aus dem Vorliegen eines so umfangreichen zusammenfassenden Werkes zwei wichtige Aufgaben, eine didaktische und eine experimentelle. Es gilt nämlich einerseits, das Gebotene über die bloße Kenntnisnahme hinaus geistig zu verarbeiten, zu assimilieren, unserem Weltbild einzufügen und zu einer lehrbaren Darstellung zu gestalten, die wir der nächsten Generation als Ausgangsstellung vorsetzen können. Anderseits ist es oft erst auf Grund eines solchen Überblickes möglich, die ungeklärten, kritischen oder widerspruchsvollen Bereiche zu entdecken, an denen die künftige Forschung anzusetzen hat. Angesichts der Fülle des vorliegenden Stoffes werden uns diese Aufgaben wohl für eine Reihe von Jahren beschäftigen.

H. Kinzel (Wien).

Linder, A.: Statistische Methoden für Naturwissenschaftler, Mediziner und Ingenieure. Dritte umgearbeitete und stark erweiterte Auflage. Mit 58 Figuren und 73 Beispielen, 484 S. Basel und Stuttgart: Birkhäuser Verlag 1960. Ganzleinen sFr. 34.—, DM 34.—.

Der „Linder" — in wenigen Jahren weit über das deutsche Sprachgebiet hinaus bekannt geworden und nun in der 3., stark erweiterten Auflage erschienen, ist ein ganz vorzügliches, ein absolut zuverlässiges Buch.

Die Erweiterung sieht man der 3. Auflage schon äußerlich an: Vor uns liegt ein gewichtiger Band von fast 500 Seiten. Die Ausstattung ist, wie bei

allen Büchern dieses Verlages, kaum zu übertreffen. In einer einleitenden Inhaltsübersicht ist kurz dargestellt, was der Leser in den einzelnen Abschnitten finden wird. Er richtet sich wohl an diejenigen Leser, denen das schlagwortartige Inhaltsverzeichnis zu wenig aussagt oder nicht verständlich ist. Wir meinen, daß diese Einleitung nur einen Nachteil hat: Sie ist zu kurz. Viele Leser würden dem Autor danken, wenn er sich entschließen könnte, aus der Einleitung (2 Seiten) eine Einführung (20 Seiten) zu machen. Als Appendix wäre daran anschließend ein lexikonartiges Schlagwortverzeichnis der wichtigsten statistischen Ausdrücke und Zeichen, mit der Bedeutung, mit der sie in diesem Buch gebraucht werden, für den Lernenden von Nutzen. Zur schnellen Orientierung ist das Verzeichnis der im Buch durchgerechneten Beispiele von großem Wert, da bei der gezielten Benutzung des Bandes der Vergleich dieser Beispiele mit den eigenen noch zu berechnenden Problemen oft schneller zum Auffinden der geeigneten Methode führt als das Inhaltsverzeichnis.

Über die Sorgfalt und die Exaktheit der Darstellung aller Abschnitte ist nichts zu sagen: Sie hat dem Autor das große Ansehen eingetragen, das er heute besonders bei Statistikern, Mathematikern, kurz: bei allen, die rechnen können, nicht nur hierzulande genießt. Das Buch bedarf für diese Leserkreise keiner Empfehlung mehr. Ein Blick auf einen Teil des Inhalts mag einen Eindruck von der Reichhaltigkeit der neuen Auflage geben:

Häufigkeitsverteilung, Durchschnitt, Streuung; Schätzungs- und Prüfverfahren (Stichprobe und Grundgesamtheit, Schätzen von Parametern, Prüfen von Hypothesen, Vertrauensgrenzen); Beurteilen von Häufigkeiten; Beurteilen von Durchschnitten und Streuungen (Normalverteilung, Prüfen von Durchschnitten, Prüfen von Streuungen); Streuungszerlegung (Beurteilen der Unterschiede zwischen Durchschnitten, Bestimmung von Streuungskomponenten); Abhängigkeiten zwischen Merkmalen (Regression und Korrelation, Mitstreuungszerlegung); Schätzen von Parametern; Numerisches Rechnen; Theoretische Grundlagen (einige Wahrscheinlichkeitsverteilungen: Hypergeometrische, binomische, Poissonsche, normale, negativ binomische, multinominale Verteilung, einige Prüfverfahren. Anwendung der Prüfverteilungen, Streuungszerlegung). Leider wird sich nur ein Teil der Leser von der Zuverlässigkeit selbst überzeugen und an der Vorzüglichkeit erfreuen können. Das Buch ist, wie der Titel besagt, für Naturwissenschaftler, Mediziner und Ingenieure gedacht. Es ehrt Biologen und Mediziner, daß der Autor eine so hohe Meinung von ihren mathematischen Vorkenntnissen hat. Und es wäre kein Wort darüber zu verlieren, wenn die Medaille nicht auch eine Kehrseite hätte: Die Statistik hat in der Biologie, zunächst in der Genetik, mit vollem Recht gegen viele Widerstände immer weiter an Raum gewonnen. Die Zahl der statistischen Methoden ist gewachsen, die Anwendungsbereiche sind wohl definiert, ihre Grenzen sind zu einem guten Teil bekannt. Der große Nutzen ist unbestreitbar. Daher sollten alle Einsichtigen für die Verbreitung dieses Wissens sorgen. Im Ausland geschieht dies mehr als bei uns. Vorbilder seien die USA oder auch die Niederlande.

Die Verbreitung kann durch Vorlesungen oder durch Bücher erfolgen. Es gibt bei uns leider nur wenige Universitäten, die geeignete in den statistischen Methoden geschulte Dozenten haben. Noch seltener gibt es zentrale Beratungsstellen für Statistik, an die sich der Wissenschaftler mit seinen Problemen wenden und um Mithilfe bitten kann. Insbesondere verlangen viele biologische Fragestellungen vom mathematischen Statistiker zunächst ein zeitlich aufwendiges Hineindenken in das zur statistischen Untersuchung vorgelegte Versuchsmaterial. Die andere Möglichkeit ist das Selbsterarbeiten der statistischen Methoden aus Büchern, wobei das Einflechten von durchgerechneten Beispielen, wie dies auch Linder tut, bei der Wahl des richtigen, besten Verfahrens große Erleichterungen bietet. Diese Bücher sollten aber darauf Rücksicht nehmen, daß ein nicht geringer Teil der Leser nicht viel mehr mitbringt, als wenig mathematische Kenntnisse

und sehr viel guten Willen. Ein Mathematiker, Ingenieur, Physiker oder beispielsweise Mineraloge — alle des Rechnens gewohnt — werden die „Statistischen Methoden" mit viel Vergnügen und zumutbaren Anstrengungen durcharbeiten können. Der Biologe jedoch, und hier sollte man sich im Interesse der Sache nichts vormachen, wird (abgesehen von zählbaren Ausnahmen) hierzu nicht in der Lage sein. Schade, wenn solch ein Leser den Eindruck gewinnt, daß Statistik nichts für ihn wäre und er das Buch im Regal verstauben läßt. Schlimm, wenn er Halb- oder Unverstandenes in seine wissenschaftlichen Arbeiten hineinnähme. Er würde mithelfen, den bösen Slogan zu stützen: Mit Statistik kann man alles beweisen! — Daher würden wir uns von Linder für diesen Leserkreis eine leicht lesbar und im mathematischen Teil reduzierte „Einführung in statistische Methoden" wünschen, gleich zuverlässig und präzise wie das große Werk. Gerade Linder, der, obwohl Mathematiker, in engem Kontakt mit Biologen und Medizinern und ihren Problemen steht, wäre hierzu wie nur wenige andere der geeignete Autor.

E. Kuhnke (Bonn).

Linskens, H. F. und **L. Stange: Praktikum der Papierchromatographie.** Anleitung zu Übungen in der papierchromatographischen Untersuchung pflanzlicher Inhaltsstoffe. Mit 27 Abbildungen, VIII, 51 S. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer-Verlag 1961. Spiralheftung DM 9.80.

Obwohl noch nicht einmal zwei Jahrzehnte seit der Begründung der Papierchromatographie verstrichen sind, hat diese Methode so an Boden gewonnen, daß es an der Zeit scheint, sie auch gelegentlich in die Unterrichtspraxis einzuführen. Namentlich dem Biologen, der nicht immer ein geschulter Chemiker ist und sein kann, kommt diese Methode aus mehreren Gründen entgegen. Zur qualitativen Aufschlüsselung eines Extraktes genügen wenige Tropfen und gerade das ist es, was dem wissenschaftlich arbeitenden Biologen so oft erwünscht ist. Der geringe Aufwand und die einfache Arbeitsweise kommen einer breiteren Anwendung sehr zugute.

Zusammenfassende Darstellungen zur Papierchromatographie der verschiedenen Stoffklassen gibt es schon eine ganze Reihe. Hier bietet nun das „Praktikum" eine ausgezeichnete Vorschule zum erfolgreichen papierchromatographischen Arbeiten auf pflanzlichem Sektor, wie es etwa in Linskens „Papierchromatographie in der Botanik", 2. Aufl., 1959, umrissen ist. Für die Praxis wichtige, vom Anfänger aber leicht übersehene Punkte wie z. B. Papiersorte, Papierzuschnitt, Laufrichtung, Wahl des geeigneten Laufmittels usw. werden gehörig hervorgehoben und in zwölf knappen Übungen die papierchromatographische Erfassung der wichtigsten Stoffgruppen unter Anwendung der gängigsten Methoden und Kunstgriffe vorgeführt; zweckmäßige Protokollierung wird durch eigene Vordrucke erleichtert.

Wenn dem sehr gut ausgestatteten und auch mit kurzen Literaturhinweisen versehenen „Praktikum" noch etwas zu wünschen bleibt, so wäre es vielleicht die anhangsweise Beantwortung der gestellten Fragen und die Angabe der Sollwerte, besonders zur Kontrolle für den allein Arbeitenden.

Der Anfänger sei ergänzend noch auf die ganz hervorragend ausgestattete „Chromatographie unter besonderer Berücksichtigung der Papierchromatographie", E. Merck AG., Darmstadt, zusammengestellt v. D. Waldi, 2. Aufl., verwiesen, wo ebenfalls die grundlegenden Fragen der papierchromatographischen Technik und die so wichtige Angelegenheit der Beschaffung vertrauenswürdiger Vergleichssubstanzen angeschnitten werden.

Nun bleibt nur zu hoffen, daß tatsächlich das eine oder andere Beispiel des „Praktikums" in unseren biologischen Übungsbetrieb Eingang findet und dem, der zu dieser Methodik greifen will, die ersten Schritte erleichtert.

J. Hölzl (Wien).

The Proceedings of the European Regional Conference on Electron Microscopy Delft 1960. Edited by A. L. Houwink and B. J. Spit. Vol. II, p. 609—1075. Delft: De Nederlandse Vereniging voor Electronenmicroscopie. Gesamtpreis der Bände I und II: 135.— Holländ. Gulden.

Es ist der Verdienst der Holländischen Gesellschaft für Elektronenmikroskopie, besonders aber wohl der Herausgeber dieses Werkes, daß alle auf der letzten europäischen Regionaltagung gehaltenen Vorträge (in dem zu besprechenden Band II, der den biologisch-medizinischen Teil enthält, allein 107 Beiträge) so schnell und in vorzüglicher Ausstattung erschienen sind. Der Band I enthält den physikalisch-technischen Teil der Vorträge und ist hier nicht Gegenstand der Rezension. Für den Käufer ist es aber wichtig zu wissen, daß beide Bände nur zusammen bezogen werden können. Der erstaunlich niedrige Preis für beide Bände läßt dies aber nicht als Nachteil erscheinen, zumal auch für den Biologen und Mediziner der Inhalt des 1. Bandes nicht ohne Interesse und Wichtigkeit ist und daher gerne „mit in Kauf genommen" werden sollte.

Der Eröffnungsvortrag der Tagung von W. Bernhard unterstreicht durch einen Rückblick auf die Entwicklung der Cytomorphologie in den vergangenen 10 Jahren die heutige Bedeutung der Elektronenmikroskopie und gibt gleichzeitig die „Perspektiven der Zukunft", die, auch wenn die Geschwindigkeit der Entwicklung nachlassen muß und wird, zu großem Optimismus berechtigen. Es ist zweifellos nicht übertrieben zu formulieren, daß wir im vergangenen Jahrzehnt in ein neues „goldenes Zeitalter der Cytologie" eingetreten sind, das uns auch jetzt noch nicht absehbare Fortschritte in der Erkenntnis bringen wird.

Im Rahmen dieser Besprechung ist es unmöglich, auf einzelne Beiträge einzugehen. Einer der größten Abschnitte ist der *cytologischen Technik* gewidmet und beinhaltet Arbeiten, die sich mit der Verbesserung der Einbettungsverfahren, der Cytochemie und mit dem elektronenmikroskopischen Glykogennachweis beschäftigen. Von ebenso allgemeiner Wichtigkeit sind vier Vorträge über die *Wechselwirkungen Strahl—Objekt.* Den größten Teil des Bandes nehmen die Ergebnisse aus den verschiedensten Teilgebieten der Histologie und Cytologie ein. Die Unterteilung, die gleichzeitig einen Überblick über den Inhalt gibt, wurde folgendermaßen vorgenommen: *Nukleinsäuren und andere Makromoleküle; Lipoid-Filme; Allgemeine Cytologie; Cytoplasmatische Membranen; Muskel; Haut; Knochen; Nerven; Sinnesorgane; Sekretorische Organe; Histologie und Pathologie; Cilien; Spermatogenese; Viren; Tumor-Viren; Bacteriophagen; Bakterien; Pflanzliche Cytologie.*

Der Tagungsbericht ist reich und vorzüglich bebildert und spiegelt mit seiner Vielseitigkeit der histologischen und cytologischen Themen den derzeitigen Wert der Elektronenmikroskopie in Biologie und Medizin wieder: Diese jüngste übernationale Tagung im europäischen Raum bewies sowohl durch das hohe technische Niveau der Beiträge als auch durch die jetzt erzielte Breite der elektronenmikroskopischen Forschung, daß die Cytologie in einen neuen Abschnitt ihrer Geschichte eingetreten ist. Die Vielzahl allein der neuen cytologischen Erkenntnisse — und das ist der beängstigende Eindruck, den dieser Tagungsbericht vermittelt — ist von einem Einzelnen nicht mehr voll zu überblicken.

K. E. Wohlfarth-Bottermann (Bonn).

Mercer, E. H. und **M. S. C. Birbeck: Electron Microscopy.** A Handbook for Biologists. With 4 figures, VII, 76 p. Oxford: Blackwell Scientific Publications. 1961. 9 s 6 d.

Infolge der schnellen Entwicklung der elektronenmikroskopischen Verfahren, die, soweit es sich um die Dünnschneide-Technik handelt, plötzlich im letzten Jahrzehnt vor sich ging und auch jetzt noch nicht abgeschlossen

ist, fehlt bisher den Biologen und Medizinern ein „Romeis" der Elektronenmikroskopie. Zwar will und kann das zu besprechende kleine Heft diese Lücke nicht füllen; es ist jedoch zu begrüßen, daß mit seinem Erscheinen die wichtigsten praktischen Verfahren klar skizziert worden sind. Die Problematik dieser Schrift liegt in ihrer Kürze: Mit 32 Literaturangaben und 20 Formeln zum Ansetzen von Lösungen sind zwar dem Anfänger die ersten Präparationsversuche erleichtert, dem in der Technik Erfahrenen ist der Stoff jedoch zu schmal für ein „Hand-" bzw. „Nachschlagebuch". Die Autoren wollten aber ausdrücklich eine Anweisung für Anfänger schreiben. Sie behandeln im ersten Teil Fixation, Waschen und Entwässern, Einbettung, Kontrastierung, Mikrotomie, einige spezielle Methoden sowie die Photographie und geben im 2. Teil neben den schon erwähnten Literaturzitaten und einem Bezugsquellennachweis Formeln und Anweisungen zum Ansatz der benötigten Lösungen.

Vielleicht besteht auch die Gefahr, daß durch die extreme Kürze die Schwierigkeiten und Unsicherheiten der Methode unterschätzt werden. Auf zwei sachliche Fehler sei hingewiesen: Im Gegensatz zur Angabe der Autoren ist bekannt, daß auch Araldit und Vestopal W als Dünnschnitte dem Elektronenstrahl gegenüber nicht völlig stabil sind, sondern bedeutsam abdampfen. Auch Schnitte dieser Polyester lassen sich, wenn auch schwer, mit lichtmikroskopischen Farbstoffen verhältnismäßig befriedigend anfärben.

Man darf wünschen, daß das vorliegende Heft den Grundstock zu einer erweiterten Neuauflage bilden wird und sollte es Anfängern für eine erste Orientierung, Techn. Assistentinnen als Nachschlagebuch empfehlen.

K. E. Wohlfarth-Bottermann (Bonn).

Rudzinska, Maria A.: The Use of a Protozoan for Studies on Aging. I. Differences between Young and Old Organisms of *Tokophrya infusionum* as Revealed by Light and Electron Microscopy. J. of Gerontol. *16*, 213—224 (1961).

Soweit Protozoen sich durch Zweiteilung ihres Plasmaleibes vermehren, bilden sie ein denkbar ungeeignetes Material zum Aufsuchen morphologischer Altersveränderungen ihres Plasmas. Daher wird die durch Knospung sich fortpflanzende *Tokophrya*-Art gewählt, deren bakterienfreie Stammkulturen mit der auf Proteose-Peptonagar herangezogenen *Tetrahymena pyriformis* gefüttert werden. Für lichtmikroskopische Untersuchungen wird der sessile Frischwasserbewohner im hängenden Tropfen am Deckglas kultiviert, fixiert wird mit 2% OsO_4, gefärbt nach Feulgens Fuchsin-Schwefelsäuretechnik. Für Elektronenmikrogramme werden die vom Substrat abgelösten Tiere ½ Std. in 1% OsO_4 bei pH 8,5 fixiert und nach Entwässern durch Alkohol in n-Butyl-Methacrylat eingebettet; polymerisiert wird bei 45 oder 60° C über Nacht. Unterschieden werden junge Tiere von 3 bis 4 und alte von 8 bis 10 Tagen Kulturdauer.

Abgesehen von Unterschieden in Größe und Körperform zeigt das Cytoplasma alternder Tiere große Bezirke mit Partikeln von 300 Å Durchmesser, die als unlösliche Schlackenmaterialien gedeutet werden; auch ist das endoplasmatische Retikulum reduziert und die Zahl der Mitochondrien und fingerähnlicher Projektionen innerer Membranen herabgesetzt. Reichlich angehäuft findet sich ferner, vielfach in Verbindung mit Mitochondrien, ein Pigment, welches mit jenem alternder Säugerzellen verglichen wird. (Es wäre sicher von Interesse gewesen, das Cytoplasma der alternden Tiere auch auf chemische und färberische Veränderungen gegenüber den jungen Individuen zu vergleichen und die unterschiedliche Viskosität zu bestimmen. Ref. erinnert sich jedenfalls an die Viskositätszunahme alternden Cytoplasmas in eigenen Versuchen mit einer nicht mehr bekannten Protozoen-

Art, welche er anläßlich seiner Amerikareise von seinem leider heimgegangenen Freunde William Seifriz erhalten hatte.)

Hans H. Pfeiffer (Bremen).

Tartar, V.: The Biology of *Stentor*. With 99 figures, X, 413 p. (International Series of Monographs on Pure and Applied Biology. Division: Zoology. Vol. 5.) Oxford-London-New York-Paris: Pergamon Press. 1961. 75 s.

Die monographische Bearbeitung und kritische Sichtung möglichst aller Kenntnisse, die im Laufe der Zeit über einen Zelltyp gewonnen wurden, ist heute wichtig, wenn man immer wieder feststellen muß, daß die ältere Literatur — besonders in amerikanischen Arbeiten — oft weitgehend unbekannt ist und daher unberücksichtigt bleibt. Mit insgesamt über 200 ausführlichen Literaturangaben sowohl des neuesten als auch des ältesten Schrifttums beweist das vorliegende Werk, daß die Erfassung älterer Literatur auch in der Neuen Welt grundsätzlich möglich und nützlich ist. Die Frage, ob für dies Buch ein Bedarf vorliegt, muß zweifellos aus verschiedenen Gründen bejaht werden. Wie andere Protozoen ist auch der zu den Ciliaten gehörende Zelltyp *Stentor* ein für Lehr- und Forschungszwecke nahezu ideales Objekt. Der Autor beschränkt sich nicht nur auf eine eingehende und kritische Sichtung des bislang Bekannten, sondern gibt laufend Anregungen, welche cytologischen und morphogenetischen Probleme mit Hilfe dieser, experimentell besonders günstigen Zelle zur Lösung anstehen. Die Einleitung enthält bereits eine Fülle von Anregungen. Nach einer Beschreibung der Verhaltensweisen von *Stentor* (Nahrungsauswahl, Bewegungen, Reaktionen auf verschiedene Reize) wird die Feinstruktur der Zelle behandelt, wobei der Versuch des Verfassers, lichtmikroskopische und elektronenmikroskopische Befunde soweit als möglich zu korrelieren und widerspruchslos zu erklären, besonders begrüßenswert ist. Wegen des geringen Volumens der bislang vorliegenden elektronenmikroskopischen Befunde kann dies jedoch noch nicht vollständig gelingen. Wenn hier etwas zu wünschen übrigbleibt, so könnte man anregen, den Text durch eine noch ausführlichere Bebilderung weiter zu verdeutlichen und neben den fast ausschließlich benutzten, instruktiven Schemazeichnungen doch auch einige Originalaufnahmen zu reproduzieren.

Der Abschnitt „Wachstum und Teilung" leitet über in die bei *Stentor* besonders interessierende, spontane „Reorganisation" oraler Organellen und die experimentell erzwungene Regeneration der Zelle nach mikrurgischen Eingriffen. Hier steht die Regeneration des ganzen „Kopfteiles" im Vordergrund, die mit großer Regelmäßigkeit nach experimenteller Entfernung des oralen Zellabschnittes aus einer besonderen Anlage (*oral primordium*) erfolgt. Einzelheiten dieses komplexen Regenerationsvorganges, das Verhalten der Kerne hierbei sowie der Einfluß zeitlicher und chemischer Faktoren werden unter ausführlicher Dikussion der Literatur dargelegt. Der in mikrurgischen Experimenten nicht Erfahrene wird an dieser Stelle nach Angaben über die Technik suchen und im letzten Abschnitt des Buches finden, da diese Experimente für die Cytomorphogenese von außerordentlicher Wichtigkeit sind. Hier eröffnen sich für elektronenoptische Untersuchungen große Möglichkeiten, weil die bisher allein vorliegenden, lichtmikroskopischen Befunde nicht ausreichen, um die wesentlichen Fragen nach Art und Weise der für die Regeneration und Morphogenese verantwortlichen Feinstrukturen zu klären. Das gleiche gilt für die wahrscheinlich weniger komplizierte Regeneration des Fußteiles der Zelle.

Die Aktivierung und Blockierung der Entwicklung des „oralen Primordiums" in Abhängigkeit von Implantationen von Zellteilen mit verschiedener Regenerationsbereitschaft sowie anderer Einflüsse beinhaltet in nicht

geringem Umfange eigene Untersuchungen des Autors. Bei der Darlegung des Primordiums wird das Fehlen morphologischer Kenntnisse über diesen wichtigen Zellbestandteil besonders schmerzlich. Gesichert erscheint lediglich, daß die Anlage aus corticalen Zelldifferenzierungen entsteht, jedoch ist unklar, in welcher Weise die Basalkörper (Kinetosomen) der Cilien beteiligt sind. Die Lokalisation der oralen Anlage ist jedenfals durch das Streifenmuster der cortikalen Zellzone gut möglich.

Kapitel über strukturelle Grundlagen der Zellpolarität, Erzeugung von Riesenzellen durch mikrurgische Vereinigung und die Rekonstitution der Strukturen nach Fragmentation der Zelle und weitgehend falsch orientierter Wiedervereinigung beenden die besonders interessanten Abschnitte, die die Morphogenese betreffen.

Der Reaktion der Zelle auf Einwirkung verschiedener, äußerer Einflüsse ist ein besonderer Abschnitt gewidmet: Neben der Anästhesierung der Myonemata, dem Einfluß von Salzen auf das Cytoplasma, der Suche nach Stoffwechselgradienten in der Zelle, dem Abwurf der oralen Cilien, der Pellicula und der Pigmentstreifen durch chemische Einflüsse steht die Analyse der Cilienbewegung und ihre Koordination im Vordergrund. Hier, aber auch bei den anderen Themen dieses Abschnittes zeigt sich, daß es doch wohl wünschenswert gewesen wäre, die Diskussion über den Einfluß der verschiedenen Faktoren nicht fast ausschließlich auf die Gattung *Stentor* zu beschränken, sondern in größerem Umfange vergleichend andere Ciliatengattungen heranzuziehen. Das Literaturverzeichnis hätte hierdurch leicht an Volumen verdoppelt werden können und wohl auch müssen. So kann man nicht gut bei der Erörterung des Einflusses von Salzen auf das Cytoplasma der Ciliaten an den Ergebnissen der Arbeiten von Spek vorübergehen, wenn ihre Deutung heute auch modifiziert werden muß. Dem Autor erscheint dieser Teil des Buches wohl selbst relativ schwach, wenn er zusammenfassend hierzu bemerkt, daß alle genannten Untersuchungen (nur) die Eignung von *Stentor* beweisen, den Einfluß äußerer, experimenteller Einflüsse und ihre Bedeutung für die Probleme der Zellphysiologie zu prüfen.

Die Kenntnisse über den Stoffwechsel von *Stentor* sind vergleichsweise gering (wenn man von dem Wissen über die fakultative Symbiose mit Grünalgen absieht), da biochemische Untersuchungen fast noch ganz fehlen. Vom Formwechsel und von der Funktion der Kerne interessiert besonders der Macronucleus, da die Micronuclei für die vegetative Phase der Zelle, wie sich mikrurgisch beweisen ließ, ohne Bedeutung sind.

Auch interessante genetische Fragen lassen sich experimentell bei *Stentor* verfolgen, da Individuen verschiedener Arten zu Chimären zusammengesetzt werden können und die Möglichkeit für Kerntransplantationen gegeben ist. Kapitel über die Systematik der Gattung *Stentor* und alle wichtigen Untersuchungstechniken beschließen dieses Buch, das jede Bibliothek eines zoologischen Instituts bereichern wird, darüber hinaus aber von allgemeinem biologischem Interesse sein dürfte, worüber sein Titel leicht hinwegsehen läßt. Der Zelltyp *Stentor* verspricht in steigendem Maße Eingang in die experimentelle Zellforschung zu finden, wozu dies Buch sicher beitragen wird und wozu der Autor durch seine eigenen Untersuchungen einen großen Beitrag geleistet hat. Die Bedeutung der corticalen Zellorganellen, eines „corticalen Strukturmusters" für die Cytodifferenzierung der Ciliaten ist evident, wenngleich die These, daß die Kinetosomen (Basalkörper) „Autoduplikanten" darstellen, immer noch auf einen schlüssigen Beweis wartet. Der Autor faßt die theoretischen Erörterungen und möglichen Rückschlüsse der Ergebnisse an *Stentor* in bezug auf Verhältnisse bei anderen Zellen in einem Kapitel am Schlusse des Buches zusammen. Es liegt nahe, daß er hier vielleicht dazu neigt, die Bedeutung eines corticalen Strukturmusters mit genetischer Kontinuität in seiner Verbreitung als all-

gemeines Prinzip auch bei anderen Zellen (z. B. Eizellen) zu überschätzen. Als Ausblick und Anregung hat die Vermutung hier jedoch großen Wert und rundet dies wertvolle Buch ab, das als Bereicherung der Cytologie und darüber hinaus der allgemeinen Biologie bezeichnet werden darf.

K. E. Wohlfarth-Bottermann (Bonn).

Weisz, Paul B.: Elements of Biology. Mit zahlreichen Textabb., XI, 491 S. New York-Toronto-London: McGraw-Hill Book Comp., Inc., 1961. 32 s 6 d.

„Wenn die Vorzüge eines neuen Leitfadens herausgestellt werden sollen, sagt man üblicherweise, daß er den Erfordernissen der Anfangssemester gerecht wird, aber auch älteren Studenten und sogar den Lehrern von Nutzen sein kann..." (Vorwort). Der Autor ist sich bewußt, daß „ein Grundriß mit dem Anspruch alles für alle und mit der Lehrmeinung von gestern, heute und morgen vereinbar sein müßte". P. B. Weisz hat also ganz klar die Unmöglichkeit eines solchen Vorhabens gesehen, sich aber dennoch bemüht, ein Hochschullehrbuch der Biologie für einen großen Interessentenkreis zu schreiben. Unter diesem Gesichtspunkt versuchte er, die wichtigsten Grundsätze der Lebensvorgänge verständlich zu machen. Der Stoff wurde im wesentlichen analytisch und nicht deskriptiv behandelt. Mit besonderem Nachdruck weist er darauf hin, daß die mikro- und makroskopischen Lebensäußerungen von den Molekülen und deren Zusammenspiel herrühren. Eine solche Betrachtungsweise macht es keineswegs notwendig, in die recht schwierigen Einzelheiten der modernen Chemie vorzudringen. Wichtig ist es ihm nur, daß der Leser sich daran gewöhnt, die Lebensvorgänge von den Molekülen an aufwärts zu sehen. Diese Abweichung von der bisher üblichen Unterrichtsmethode mag anfangs vielleicht etwas schwierig erscheinen; im Endeffekt ermöglicht sie ein besseres und schnelleres Verständnis des Stoffes und befriedigt mehr als die traditionelle Betrachtungsweise.

In den beiden ersten Teilen des Buches werden der Bau und die Bauprinzipien der lebenden Materie beschrieben. Teil 1 behandelt den Ursprung des Lebens und — vom Atom an aufwärts — nachfolgend alle höheren Entwicklungsstufen. Diese Abschnitte bilden die Grundlage der molekularen Betrachtungsweise. Teil 2 handelt von der Natur und Struktur der lebenden Substanz. Einem Kapitel über die Eigenschaften des Protoplasmas und den Aufbau der Zelle folgt eine Zusammenstellung der verschiedenen Organisationstypen, die er den *Monera, Protista, Metaphyta* und *Metazoa* zuordnet. Diese Vierteilung soll die alte und zu einfache Einteilung der Lebewelt in „Pflanzen" und „Tiere" ersetzen.

In den vier folgenden Kapiteln des Buches werden die typischen Vorgänge in der lebenden Materie behandelt. Teil 3 bringt eine Einführung in die neuen Erkenntnisse des Stoffwechsels. Der Verfasser führt nur ein Minimum von chemischen Einzelheiten an, ohne übermäßig zu vereinfachen. Die Reaktionsketten, z. B. bei der Photosynthese und der Atmung, sind durch neuartige, leichtverständliche Diagramme anschaulich erklärt worden. Im großen und ganzen werden nur exemplarische Beispiele in der notwendigen Tiefe abgehandelt. Die Teile 4, 5 und 6 befassen sich mit der Selbsterhaltung und zwar unter den Titeln: Zustandskontrolle, Fortpflanzung sowie Vererbung und Abstammung.

Abschließend ist zu sagen, daß das ca. 500 Seiten umfassende, reich bebilderte Werk eine durchaus brauchbare Einführung in den gesamten biologischen Unterrichtsstoff darstellt. Das Lehrbuch ist nicht nur den Biologen, sondern auch allen naturwissenschaftlich Interessierten zu empfehlen.

N. Weissenfels (Bonn).

Werner, Cl. F.: Wortelemente lateinisch-griechischer Fachausdrücke in den biologischen Wissenschaften. 2., erw. u. verb. Auflage. 471 S. Leipzig: Akademische Verlagsgesellschaft Geest u. Portig K. G., 1961. Geb. DM 22,—.

Dem jetzt in 2., verbesserter Auflage vorgelegten Werk kann man bescheinigen, daß es in keiner Institutsbibliothek biologischer und medizinischer Fachrichtung fehlen sollte. Es ist gleichermaßen für Studierende und für Lehrende von Nutzen und dürfte auch für denjenigen nicht entbehrlich sein, der sehr gute Schulkenntnisse in den klassischen Sprachen besitzt. Die neue Auflage wurde insbesondere in Richtung zur medizinischen Anatomie und Physiologie erweitert, das größte Ausmaß an Vollständigkeit (die weder erstrebt wurde noch erzielt werden kann) ist allerdings auf dem zoologischen Sektor vorhanden, wo fast ein zoologisches Fachwörterbuch ersetzt wird.

Beim Durchblättern fiel auf: Auf den Seiten 31 und 377 wird das Wort N u k l e i n s ä u r e mit *k* geschrieben, auf Seite 303 (entsprechend der lateinischen Herkunft) mit *c*. Soll hier dem Benutzer die Qual der Wahl verbleiben?

Allein wenn man sich daran erinnert, wieviel Arbeit und Mißverständnisse in der systematischen Taxonomie bei richtiger Kenntnis lateinischer und griechischer Wortelemente hätten vermieden werden können, muß man die hier erzielte Materialsammlung für äußerst wertvoll halten — man kann nur hoffen, daß sie von allen denjenigen benutzt wird, für die sie erarbeitet wurde. Zu diesem Kreis dürften allerdings nicht nur Systematiker, sondern alle jene Forscher, Lehrende und Lernende gehören, die sich mit den biologischen Wissenschaften beschäftigen — ein außergewöhnlich großer Benutzerkreis also, an den sich das Buch wendet. Es verbleibt eine Weiterführung dieses Werkes zu wünschen.

K. E. W o h l f a r t h - B o t t e r m a n n (Bonn).

Herausgeber, Eigentümer und Verleger: Springer-Verlag, Wien I, Mölkerbastei 5. — Für den Inhalt verantwortlich: Prof. Dr. Karl Höfler, Universität Wien, Prof. Dr. E. Perner, Tierärztliche Hochschule, Hannover und Doz. Dr. K. E. Wohlfarth-Bottermann, Universität Bonn — Druck: Adolf Holzhausens Nfg., Wien VII, Kandlgasse 19-21

Bei der Schriftleitung sind folgende weitere Arbeiten eingelangt:

Barthelmess, A., und A. Elkabarity: Chemisch induzierte multipolare Mitosen, III. 5. 6. 1961

Yoshida, Y.: The Nuclear Control of Chloroplast Activity in *Elodea* Leaf Cells 22. 6. 1961

Koehler, J. K.: Electron Microscope Observations of Radiation-induced Hela Giant Cells 23. 6. 1961

Nagai, S.: Reduction of Silver Nitrate by Cystoliths of *Ficus elastica* . . 23. 6. 1961

Zarzycki, J.: Histochemische Untersuchungen über den Gehalt von Sukzinodehydrase in der Milchdrüse während der Lactation 30. 6. 1961

Pillai, P. A.: Electron Microscopic Studies on the Epidermis of Newt with an Enquiry into the Problem of Induced Neoplasia 3. 7. 1961

Wohlfarth-Bottermann, K. E.: Weitreichende, fibrilläre Protoplasmadifferenzierungen und ihre Bedeutung für die Protoplasmaströmung. (I. Elektronenmikroskopischer Nachweis und Feinstruktur) 15. 7. 1961

Weissenfels, N.: Der Einfluß der Gewebezüchtung auf die Morphologie der Hühnerherzmyoblasten. (III. Der Einfluß der Ernährung auf die Entstehung der Cytosomen) 15. 7. 1961

Sitte, P.: Zum Feinbau der Suberinschichten im Flaschenkork 31. 8. 1961

Sitte, P.: Polarisationsmikroskopie der Mitose in vivo bei Staminarhaarzellen von *Tradescantia* 31. 8. 1961

Franke, I.: Untersuchungen über den Einfluß des Frostes auf Blattparenchymzellen von *Polypodium vulgare* 1. 9. 1961

Wehrmeyer, W., und E. Perner: Der submikroskopische Bau der Grana in den Chloroplasten von *Spinacia oleracea* L. 2. 9. 1961

Sun, C. H.: Submicroscopic Structure and Development of the Chloroplast and Pyrenoid in *Anthoceros Laevis* L. 28. 9. 1961

Weissenfels, N.: Der Einfluß der Gewebezüchtung auf die Morphologie der Hühnerherzmyoblasten. (IV. Über Differenzierungs- und Abbauvorgänge an den Muskelelementen) 4. 10. 1961

Milovidov, P.: Unterscheidungsmerkmale zwischen einander ähnlichen Zellstrukturen in fixierten Präparaten 17. 10. 1961

Falk, H.: Beiträge zur Ultrahistologie der Wurzelspitze bei *Allium cepa* . . 18. 10. 1961

Heinrich, G.: Fusarinsäure in ihrer Wirkung auf die Wasserpermeabilität des Protoplasmas 23. 10. 1961

Burian, K.: Vitalfärbungen an Epidermiszellen von *Platanthera bifolia* mit Toluidinblau und Pyronin 25. 10. 1961

Eberl-Rothe, Gertrude: Über die silberimprägnierten Fasern der Schwämme 25. 10. 1961

Wessing, A.: Elektronenmikroskopische Studien zur Funktion der Malpighischen Gefäße von *Drosophila melanogaster*. (I. Die Gefäße der Larve und Imago) 28. 10. 1961

Wessing, A.: Die Transformation der Mitochondrien in den Malpighischen Gefäßen von *Drosophila melanogaster* 2. 11. 1961

Falk, H.: Spiralige Anordnung von Ribosomen in Pflanzenzellen 10. 11. 1961

Reichart, G.: Entwicklungsphysiologische Untersuchungen an *Spyrogyra* unter besonderer Berücksichtigung der Geschlechtsbestimmung 14. 11. 1961

Wetzstein, R., W. Doerfler und A. Schwink: Die Feinstruktur der enterochromaffinen Zellen und ihrer spezifischen Granula. 17. 11. 1961

SPRINGER-VERLAG IN WIEN

Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe
Progress in the Chemistry of Organic Natural Products
Progrès dans la chimie des substances organiques naturelles

Herausgegeben von

L. Zechmeister

California Institute of Technology, Pasadena, USA

Zuletzt erschien:

Band XIX: Mit 16 Abbildungen. VIII, 420 Seiten. Gr.-8°. 1961.

S 466.–, DM 74.–, sfr. 79.60, $ 18.50

Ganzleinen S 490.–, DM 78.–, sfr. 83.90, $ 19.50

Inhaltsverzeichnis: **Šorm, F.,** Medium-ring Terpenes. — **Nozoe, T.,** and **S. Itô,** Recent Advances in the Chemistry of Azulenes and Natural Hydroazulenes. — **Crombie, L.,** and **M. Elliott,** Chemistry of Natural Pyrethrins. — **Barton, D. H. R.,** and **G. A. Morrison,** Conformational Analysis of Steroids and Related Natural Products. — **Van Tamelen, E. E.,** Biogenetic-type Syntheses of Natural Products. — **Schlubach, H. H.,** Der Kohlenhydratstoffwechsel im Roggen und Weizen. — **Courtois, J. E.,** et **A. Line,** Les phosphatases des végétaux supérieurs: répartition et action.

Archiv für die gesamte Virusforschung

Begründet von **R. Doerr**

Herausgegeben von **S. Gard,** Stockholm, **C. Hallauer,** Bern, **K. F. Meyer,** San Francisco **E. G. Nauck,** Hamburg, **A. B. Sabin,** Cincinnati

Schriftleitung: **C. Hallauer,** Bern

Zuletzt erschien:

Band XI, Heft 3. (Abgeschlossen im September 1961.) Mit 37 Abbildungen. 166 Seiten. 1961.

S 250.–, DM 39.70, sfr. 42.70, $ 9.95

Inhaltsverzeichnis: **Mayr, A.,** und **Katharina Kalcher,** Plaque-Bildung bei den Geflügelpockenviren. — **Sibalin, M.,** Cross-Neutralization Tests with Swine Enterovirus Strain S 180/4, and Teschen, Talfan, and Swine Polio-Encephalomyelitis Viruses. — **Lund, Ebba,** Inactivation of Poliomyelitis Virus by Chlorination at Different Oxidation Potentials. — **Hsiung, G. D.,** Multiplication of Poliovirus in Tissue Cultures Previously Infected with Other Enteroviruses. — **Dubes, G. R.,** and **O. Tolbert,** Transfer of Nongenetic Thermostability from Genetically Thermostable to Genetically Thermolabile Poliovirus. — **Duncan, I. B. R.,** and **M. C. Timbury,** Physical Characteristics of Frater Virus. — **Subak-Sharpe, H.,** The Effect of Passage History, Route of Inoculation, Virus Strain and Host Strain on the Susceptibility of Adult Mice to the Virus of Foot-and-Mouth Disease. — **Müller, F.,** Quantitative Untersuchungen über den direkten und indirekten fluoreszenzserologischen Nachweis der Komplementbindung an Enterovirus-Antikörper-Komplexe. — **Traub, E.,** Interference with Eastern Equine Encephalomyelitis (EEE) Virus in the Brains of Mice Immune to Lymphocytic Choriomeningitis (LCM). — **Kääriäinen, L.,** and **P. Halonen,** Metabolic Inhibition Test for Louping-Ill, Measles and Herpes Simplex Virus in Plastic Panels. — **Diefenthal, W.,** und **K.-O. Habermehl,** Quantitative Untersuchungen über Adsorption und Eklipsephase bei Ektromelievirus (Mäusepocken). — **Döhner, L.,** Quantitative Untersuchungen zur Konservierung menschlicher Zellen bei tiefen Temperaturen.

Zu beziehen durch Ihre Buchhandlung